Der Einfluß eines schnellen Kalium-Stromes in der Zellmembran auf erregende synaptische Potentiale in Nervenzellen von Schnecken

Jürgen Daut

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556029_0026

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Direktor: Prof. D. Ploog

DER EINFLUSS EINES SCHNELLEN KALIUM-STROMES IN DER ZELLMEMBRAN AUF ERREGENDE SYNAPTISCHE POTENTIALE IN NERVENZELLEN VON SCHNECKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jürgen Daut
aus
Kallstadt

Dezember 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
1. Referent: Priv.-Doz. Dr.H.D.Lux
2. Referent: Prof. K. Thurau

Tag der mündlichen Prüfung: 26.3.1974

Die Experimente für die vorliegende Arbeit wurden in den Jahren 1971 und 1972 am Max-Planck-Institut für Psychiatrie ausgeführt. Im Laufe dieser Zeit haben mir viele Leute geholfen.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. H.D. Lux und Herrn Dr. E. Neher, von denen ich sowohl in der Theorie als auch in experimenteller Technik viel gelernt habe. Große Teile dieser Arbeit beruhen auf Ideen, die sich in den langen Diskussionen mit ihnen ergaben.

Frl. M. Neuner hat als MTA insbesondere durch ihr Geschick bei der Anfertigung der 5 MegOhm/1 u Mikroelektroden zum Gelingen der Experimente beigetragen.

Bei Frau Springorum und Herrn Kallert möchte ich mich für die großzügige Hilfe bei der fotografischen Reproduktion der Abbildungen bedanken.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einem Artikel in Nature New Biology, Vol. 246, pp. 193-196 (1973), veröffentlicht.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Zusammenfassung

II. Einleitung

1. Über die medizinische Relevanz von Untersuchungen an Invertebraten
2. Über Untersuchungen an Schnecken

III. Methodik

1. Präparation
2. Ableitkammer
3. Ringerlösung und Elektroden
4. Elektronik
   - A Voltage Clamp
   - B Pipetten Clamp
   - C Konstruktion der Pipette
   - D Schaltplan

IV. Die Eigenschaften der Nervenzellen von helix pomatia

1. Morphologie
2. Membraneigenschaften
3. Passive elektrische Eigenschaften der Zellen
4. Synaptische Potentiale
5. Pharmakologie der Synapsen

6. Voltage-Clamp- Eigenschaften
A Der Einwärtsstrom und der langsame Auswärtsstrom
B Der schnelle K^+-Strom
C Zellen ohne schnellen K^+-Strom
7. Injektion von Strompulsen

V. Ergebnisse
1. Der schnelle K^+-Strom im Axon
A Theorie
B Das 1. Axon-Spike-Experiment
C Das 2. Axon-Spike-Experiment
D Der Beitrag der passiven Polarisation des Axons
E Die langsame hyperpolarisierende Welle
F Die dominierende Rolle des schnellen K^+-Stromes im Axon
2. Der Einfluß des schnellen K^+- Stromes auf antidrome Spikes
A Umschalt-Experimente
B Hyperpolarisation der Zelle
3. Der Einfluß des schnellen K^+- Stromes auf EPSPs
A Umschalt-Experimente
B Hyperpolarisation der Zelle

VI. Diskussion

I. ZUSAMMENFASSUNG

Wenn man versucht, Nervenzellen von Schnecken durch Injektion von Strompulsen zu depolarisieren, findet man unter bestimmten Bedingungen, daß der Depolarisation ab einer bestimmten Schwelle vorübergehend eine Kraft entgegenwirkt. Diese Gegenkraft ist ein von Kaliumionen getragener Strom, der die depolarisierende Spannungsauslenkung aufhalten oder sogar kurzzeitig umkehren kann. Er beruht auf einer vorübergehenden zeit- und spannungabhängigen Erhöhung der Permeabilität der Zell membran, also auf einem Mechanismus der gleichen Art wie der schnelle Na^+-Strom und der langsame K^+-Strom, die für den Aufstrich bzw. die Repolarisationsphase des Aktionspotentials verantwortlich sind. Dieser zusätzliche schnelle K^+-Strom wurde von Neher und Lux (1969) und Stevens (1969) entdeckt. Seine Eigenschaften wurden von E.Neher (1971) und Connor und Stevens (1972) im Detail beschrieben.

Die physiologische Funktion des schnellen K^+-Stroms ist noch unbekannt. Weil er auch unterhalb der Schwelle des Aktionspotentials wirkt, also in dem Bereich, in

dem sich die synaptische Integration abspielt, wurde in der vorliegenden Arbeit an Nervenzellen der Weinbergschnecke, helix pomatia, der Einfluß dieser Stromkomponente auf synaptische Erregung untersucht.

Da die synaptischen Potentiale im Axon, in einiger Entfernung vom Soma entstehen, mußte zuerst untersucht werden, ob der von Neher und Lux beschriebene schnelle K^+-Strom auch im Axon vorhanden ist. Mit voltage clamp-Experimenten, d.h. durch Experimente, in denen der Zelle durch elektronische Rückkopplung bestimmte Membranpotentiale aufgeprägt wurden, wurde die Ausbreitung einer Depolarisation vom Zellsoma durch das Axon zur sog. Spike-Trigger-Zone untersucht. Der Modus der Ausbreitung hängt von den Membraneigenschaften des Axons ab. Durch depolarisierende Spannungsschritte im Zellsoma wurden im Axon Aktionspotentiale ausgelöst. Es zeigte sich, daß die Latenz dieser Axon-Spikes mit dem Grad der Aktivation des schnellen K^+-Stromes eng korreliert ist. Durch Analyse dieser Korrelation unter verschiedenen Bedingungen konnte gezeigt werden, daß der schnelle K^+-Strom auch im Axon vorhanden ist.

Durch eine Serie von "Umschalt"-Experimenten wurde dann der Einfluß des schnellen K^+-Stroms auf antidrome Spikes und erregende postsynaptische Potentiale untersucht. Durch konditionierende Spannungsschritte wurde der Grad der Aktivation des schnellen K^+-Stroms variiert. Danach wurde elektronisch von voltage clamp auf normale Spannungsregistrierung umgeschaltet und

die resultierende Antwort der Zelle auf antidrome Erregung oder einen konstanten synaptischen Reiz registriert.

Es konnte gezeigt werden, daß die vorübergehende Erhöhung der K^+-Permeabilität einen sehr starken hemmenden Einfluß auf die Antwort der Zelle auf synaptische und antidrome Erregung hat. Sie stellt einen shunt für den erregenden synaptischen Strom dar; darüberhinaus wirkt der durch sie hervorgerufene K^+-Auswärtsstrom durch seinen hyperpolarisierenden "drive" zusätzlich der synaptischen Depolarisation entgegen.

Der Grad der Aktivierung dieses schnellen K^+-Stromes hängt in nichtlinearer Weise vom Membranpotential der Zelle ab. Schon durch geringe Änderung des Membranpotentials kann die Zelle also eine starke Änderung ihrer Antwort auf synaptische Erregung bewirken. Die Höhe des Membranpotentials hängt bei Schneckenneuronen von der Aktivität der elektrogenen Na^+-Pumpe in der Zellmembran ab und fluktuiert auch in vivo in dem Bereich, in dem der Aktivationszustand des schnellen K^+-Stromes starken Änderungen unterliegt.

Für die "Funktion" des schnellen K^+-Stromes wird folgende Hypothese aufgestellt. Die Nervenzelle variiert durch Änderung der Aktivität der metabolischen Natriumpumpe ihr Membranpotential, Dadurch wird der Grad der Aktivation des schnellen K^+-Stroms, und somit sein hemmender Effekt moduliert. Der schnelle K^+-Strom stellt also eine Art"innere Hemmung"dar, einen Mechanis-

mus, mit dem die Zelle die Effizienz ihres synaptischen Inputs kontrollieren kann.

II. EINLEITUNG

1. Über die medizinische Relevanz von Untersuchungen an Invertebraten

Da das Nervensystem der Schnecke doch sehr verschieden von dem des Menschen ist, stellt sich die Frage nach der praktischen Relevanz von Untersuchungen an Invertebraten.

Wenn man ein komplexes System wie den Organismus des Menschen "verstehen" will, ist es am besten, wenn man von den einzelnen Bauelementen und ihren chemischen und physikalischen Grundprinzipien ausgeht, und dann diese mit anderen Bausteinen in Beziehung setzt. Das Ziel ist, das Funktionieren des Organismus synthetisch, d.h. als Zusammenspiel vieler elementarer Mechanismen, verstehen zu können. Das ist notwendig, wenn man zu einer kausalen Therapie oder kontrollierten Vorbeugung von Krankheiten kommen will und nicht auf die empirisch gefundenen "Zusammenhänge" und die sich daraus ergebenden Beeinflussungsmöglichkeiten angewiesen sein will, wie das heute noch bei weitaus dem meisten Krankheiten der Fall ist.

In Zeiträumen der Evolution gesehen, sind wir auch mit primitiven Tieren recht nahe verwandt. Der letzte gemeinsame Vorfahre von Schnecke und Mensch lebte zwar schon vor fast 500 Millionen Jahren, aber er hatte schon

mehr als 3 Milliarden Jahre Evolution hinter sich, und viele zelluläre Funktionselemente waren schon so weit optimiert, daß sie im Prinzip nicht mehr verändert wurden.Eine Übertragung der bei einfachen Lebewesen gewonnenen Erkenntnisse erscheint in vielen Fällen berechtigt zu sein, zumal es sich herausgestellt hat, daß im biochemischen Aufbau sehr verschiedener Organismen oft eine bis ins Detail gehende Übereinstimmung besteht.

Um ein Beispiel aus der Neurophysiologie zu nennen: Die Arbeiten von Armstrong und Hille (1972) zeigen, daß die biochemischen Eigenschaften der elektrisch erregbaren K^+-Kanäle im Tintenfischaxon einerseits und im Ranvierschen Schnürring des Frosches andererseits verblüffende Ähnlichkeiten aufweisen. Im Laufe von mehr als 5×10^8 Jahren getrennter Evolution hat sich also der Öffnungs- und Schließmechanismus der K^+-Kanäle in der Zellmembran nur sehr wenig verändert.

Die in allen lebenden Zellen vorhandenen elementaren Mechanismen vom genetischen Code bis hin zur Differenzierung der Zellen im Organismus wurden eigentlich zum überwiegenden Teil mit Hilfe von Experimenten an Invertebraten erforscht. Die Genetik z.B. verdankt viele Erkenntnisse über die Vererbung den Untersuchungen an Riesenchromosomen und Mutationen der Taufliege, Drosophila. Die chemische Struktur und die Replikation der DNS und die Schritte, die vom genetischen Code zur Proteinbiosynthese führen, wurden weitgehend am Bakt. E. coli erforscht. Auch der nächste Schritt, von der Synthese eines Proteins zur Funktion der Zelle im Organis-

mus, konnte durch Experimente an Invertebraten, nämlich Crustaceen, im Prinzip schon weitgehend aufgeklärt werden: Aus den Arbeiten von Kravitz und Mitarbeitern geht hervor, daß man die Differenzierung von erregenden, hemmenden, efferenten und afferenten Nervenfasern auf ein entscheidendes Ereignis zurückführen kann, nämlich die Synthese eines einzigen Enzyms (siehe Barker et al. (1972)). Die Ausdifferenzierung sensibler Fasern, die zur Peripherie hin aussprossen, induziert wiederum die ontogenetische Entwicklung aller Haut- und Geschmackssinnesorgane (siehe Jacobsen, 1972).

Das Verstehen dieser Vorgänge könnte möglicherweise zu einer Therapie von Sensibilitätsstörungen etc. führen.

Dieses Beispiel soll zeigen, auf welche Weise durch immer tieferes Eindringen in die Chemie lebender Zellen und durch stufenweises Zusammensetzen der so gewonnenen Erkenntnisse, die Grundlagenforschung von Bedeutung für die Medizin sein kann. In der Regel führen jedoch solche grundlegenden Erkenntnisse noch nicht unmittelbar zu einer kausalen Therapie von Krankheiten. Die ungeklärte Ätiologie der meisten Krankheiten ist ein Indiz dafür, wie groß die Lücken in unserem Wissen noch sind.

Auf dem Gebiet der Erkrankungen des zentralen Nervensystems ist unsere Unwissenheit besonders auffällig. Untersuchungen an dem einfachen Nervensystem von Schnekken sind ein Weg, der vielleicht zum Verständnis der elementaren Funktionen des ZNS beitragen kann.

2. Über Untersuchungen am Nervensystem von Schnecken

Das Nervensystem von Schnecken hat nur einige tausend Zellen, also sehr wenige im Vergleich zum Menschen, der etwa 10^{10} Nervenzellen besitzt. Die einzelnen Nervenzellen hingegen sind z.T. sehr groß und liegen leicht zugänglich, nur von einer dünnen Bindegewebskapsel überzogen, an der Oberfläche des Gehirns, so daß man mit identifizierbaren Zellen unter visueller Kontrolle experimentieren kann.

Der Bau der einzelnen Zellen ist bei Mollusken wesentlich einfacher und auch die Verschaltung der Zellen ist übersichtlicher als bei Vertebraten. Diese einfache Präparation bietet sich an für die Erforschung der Mechanismen synaptischer Integration und der Organisation neuronaler Verschaltungen. Sie ist geeignet für rigorose experimentelle Methoden und genaue Messungen, die bei den höher differenzierten Säugetiergehirnen nicht durchführbar sind.

In der Tat wurden eine ganze Reihe von grundlegenden zellulären Mechanismen im Nervensystem der Schnekken entdeckt: Tauc (1965) beschrieb Wirkungen, die die Impulsübertragung an einer Synapse auf andere Synapsen haben kann (heterosynaptische Bahnung und Hemmung). Kandel und Mitarbeiter korrelierten die Veränderungen in den Nervenzellen eines isolierten Ganglions der Meeresschnecke Aplysia bei der Konditionierung und Habituation eines einfachen Reflexbogens (des Kiemen-Rückziehrefle-

xes) mit dem Verhalten ganzer Tiere bei dem gleichen Reflex (Carew et.al., 1971). Biochemische Veränderungen in einzelnen Zellen, die eine Abhängigkeit von der synaptischen Übertragung von Impulsen zeigen, wurden gefunden (Cedar et al., 1972; Kernell, Petersen, 197o). Neue synaptische Mechanismen, wie z.B. die synaptische Aktivierung einer elektrogenen Ionenpumpe, wurden beschrieben (Kerkut et al., 1969). Auch die Existenz einer Chloridpumpe, die schon vorher auf Grund von Experimenten an Katzen postuliert worden war (Lux, 1971), wurde nun in Nervenzellen von Schnecken nachgewiesen (Russel, Brown, J. gen. Physiol. 6o). Die Abhängigkeit des Membranpotentials von der Na^+-Pumpe (Carpenter, 197o; Moreton, 1971) und der Na^+-Pumpe vom Membranpotential (Kostyuk et al., 1972) wurden an Schnecken genauer untersucht. Es ist sogar gelungen, Voltage-clamp-Experimente im Soma von Nervenzellen zu machen (Stevens, Meves, Neher und Lux, Chamberlain und Kerkut). Dabei wurde eine neue Stromkomponente in der elektrisch erregbaren Membran entdeckt: ein schneller K^+-Auswärtsstrom.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag liefern zum Verständnis der Funktion dieses schnellen Kaliumstromes. Ich werde versuchen zu zeigen, daß dieser Strom, der auf einer schnell an-und abschaltenden Erhöhung der Kaliumpermeabilität der Zellmembran beruht, einen sehr wirkungsvollen Mechanismus darstellt, mit dem die Nervenzelle ihre Antwort auf einen erregenden synaptischen Reiz modulieren kann.

III. METHODIK

1. Präparation

Die Versuche wurden an ausgewachsenen Weinbergschnecken (helix pomatia) durchgeführt. Die Tiere wurden bei Zimmertemperatur gehalten, und es wurden aktive Exemplare, deren Haus einen Durchmesser von mindestens 3 cm hatte, ausgewählt.

Zuerst wurde das Haus mit Schere und Klemme von der Schnecke abgetrennt. Dann wurde das Tier auf einer Präparationsschale aus Kork festgesteckt und durch einen mediodorsal-longitudinalen Schnitt eröffnet. Die Geschlechts- und Verdauungsorgane wurden herausgenommen und der ganze, den Ösophagus umgebende Ring von Ganglien herauspräpariert, wobei die Nerven in möglichst großem Abstand vom Unterschlundganglion durchtrennt wurden. Anschließend wurde das Ganglion in die Ableitkammer gebracht, die während des ganzen Experiments gekühlt und mit Schnecken-Ringerlösung perfundiert wurde. Der erste Teil der Präparation wurde möglichst schnell durchgeführt, um die Zellen in gutem Zustand zu erhalten.

Der zweite Teil der Präparation wurde unter einem Operationsmikroskop mit 6- bis 25facher Vergrößerung und

Dunkelfeldbeleuchtung durchgeführt. Der Ganglionring wurde mit der ventralen Seite nach oben am Boden der Kammer, die mit Sylgard ausgegossen war, mit feinen Insektennadeln festgesteckt. Durch Entfernung der Bindegewebskapsel des Unterschlundganglions wurden an der ventralen posterioren Seite die einzelnen Zellbündel und Ganglien freigelegt. Das unpaare Visceralganglion liegt medial am posterioren Ende des Unterschlundganglions. Für die hier beschriebenen Experimente wurde ausschließlich die Gruppe von etwa 1o großen Ganglienzellen benut t, die auf der ventralen Seite unmittelbar links (von ventral her gesehen also rechts) vom Eintritt des Analnerven in das Visceralganglion liegt. Das ist das gleiche Bündel von Zellen, das von Neher und Lux (1969 und 197o; Neher, 1971) untersucht worden ist. Die Zellen sind etwa 1oo - 2oo µ im Durchmesser und erlauben stabile intrazelluläre Ableitungen über mehrere Stunden, auch mit 2 oder 3 Mikroelektroden. Dazu muß allerdings die sehr feine durchsichtige Bindegewebshülle entfernt werden, die das Zellbündel umgibt. Sie wurde mit einem sehr feinen Glashaken angehoben, mit einer ophthalmologischen Schere aufgeschnitten und dann vorsichtig abgezogen.

Vom N. analis und vom N. pallialis dexter wurde am distalen Ende die Markscheide abgelöst. Das Nervenende wurde in einem Plastikröhrchen, der Reizelektrode, fixiert (siehe Abb. 2).

2. Die Ableitkammer

In Abb. 1 ist die Ableitkammer in Aufsicht und im Querschnitt dargestellt. Sie hat einen Durchmesser von 3 cm und ist in einen runden Plexiglasblock von etwa 1 cm Dicke eingefräst. Der Boden der Kammer ist in der Mitte sehr dünn, um eine gute Beleuchtung von unten (durch einen Dunkelfeldkondensor) zu gewährleisten. Ein Kühlkanal umgibt die Kammer von allen Seiten und, unter Aussparung der dünnen Scheibe im Zentrum der Kammer, auch von unten (Abb. 2B). Die Temperatur der Ringerlösung in der Kammer wurde so auf einer konstanten Temperatur ($\pm$ 1° C) gehalten, und zwar auf Werten zwischen 11° und 15° C. Der Boden der Kammer ist mit einer etwa 1 mm dicken Schicht von Sylgard ausgekleidet. Das ist eine elastische, durchsichtige, gummiartige Masse, auf der das Ganglion sehr leicht mit Insektennadeln festgesteckt werden kann und die die Sichtverhältnisse nicht beeinträchtigt.

Die Kammer faßt etwa ein Volumen von 3 ml. Sie wurde ständig mit einer Rate von ca. 3 ml pro Minute frischer Ringerlösung perfundiert, um etwaige Veränderungen in der Zusammensetzung der Ringerlösung während des Experiments zu vermeiden. Der Zufluß erfolgt durch eine Kühlspirale, die aus einem dünnen Kupferrohr angefertigt wurde und innerhalb des ringförmigen Kühlkanals liegt. Die Ringerlösung tropft von dem wie ein Wasserhahn gebogenen Ende des Kupferrohrs in die Kammer.

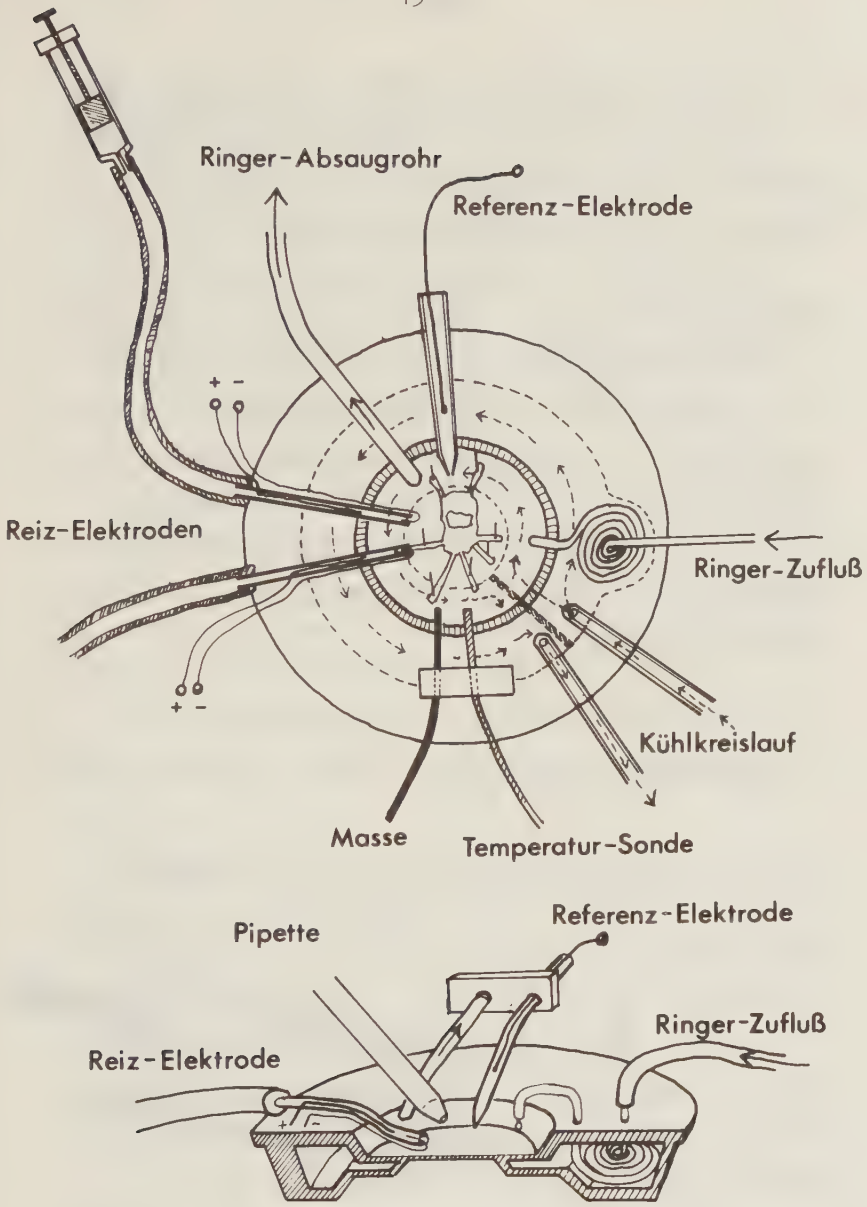


Abb. 1. Ableitkammer, Aufsicht (oben), Querschnitt, (unten).

Bei Erreichen einer bestimmten Höhe wird sie dann durch ein Plastikröhrchen an der anderen Seite der Kammer abgesaugt. So wird jeder leitende Kontakt zwischen Ringerbad und Zu- und Abflußsystem vermieden.

Die Temperatur wurde ständig durch einen Meßfühler kontrolliert (siehe Abb.1). Geerdet wurde das Ringerbad durch eine Kalomel-Elektrode, die entweder direkt mit Masse verbunden war oder, zur Strommessung, mit der virtuellen Erde am Eingang eines Operationsverstärkers. Als Referenzelektrode diente ein PVC- oder Glasröhrchen, das vorn mit zwei molarem NaCl-Agar-Gel gefüllt war; dahinter waren 2-molare NaCl-Lösung und ein gut chlorierter Silberdraht.

3. Ringerlösung und Elektroden

Die Schnecken-Ringerlösung hatte folgende Zusammensetzung (mM): 95 NaCl; 4 KCl; 8 $CaCl_2$; 1o Tris; 1o Maleinsäure; 1o NaOH und Glukose. Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt.

Die Reizelektroden wurden am Boden der Ableitkammer fest eingebaut. Sie bestehen aus je einem Plastikröhrchen, dessen Kaliber gerade groß genug ist, um den Nerv aufzunehmen und dessen hinteres Ende mit einer Spritze verbunden ist. Damit wird der Nerv in das Röhrchen eingesaugt.Die Lage des Nerven wird zusätzlich noch dadurch fixiert, daß ein am Nerven verbliebenes En-

de der Markscheide außerhalb des Röhrchens mit einer Insektennadel festgesteckt wird.(Abb. 1 und 2).

Der eine Pol der Reizelektrode besteht aus einem chlorierten Silberdraht im Innern des Röhrchens, der andere Pol wird von der Spitze eines chlorierten Silberdrahtes gebildet, der außen an dem Röhrchen entlangführt und dessen Ende von vorn in das Röhrchen hakenförmig hineingebogen ist (Abb. 2). Dieser Draht ist vollständig mit einer Uhu plus-Schicht isoliert, nur ein etwa o,5 mm langes Stück an der im Röhrchen befindlichen Spitze des Drahtes ist freigelassen. Dadurch wird erreicht, daß die Reizströme fast ausschließlich innerhalb des Röhrchens fließen und die Strommessung nicht durch Reizartefakte gestört wird.

Zur Potentialmessung wurden konventionelle Glasmikroelektroden verwendet, die auf einen äußeren Spit-

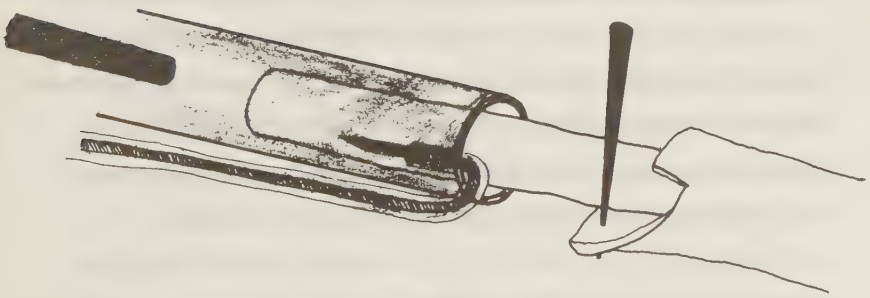


Abb. 2. Reizelektrode.

zendurchmesser von 1 - 2 µ abgebrochen wurden. Sie waren gefüllt mit einer Mischung von 1,5 M K-Citrat und 1,5 M KCl im Verhältnis 1o:1.

Die Strominjektions-Elektroden wurden mit einer Silberschicht überzogen, die dann geerdet wurde, um die kapazitive Kopplung zwischen den beiden Voltage-Clamp-Elektroden zu reduzieren.

4. Elektronik

A. Voltage-Clamp

Die Voltage-Clamp-Technik (Cole,(1949);Marmont, (1949)) ist seit über 2o Jahren als eines der wirkungsvollsten Werkzeuge zur Erforschung der Erregungsvorgänge in Nervermembranen bekannt. Sie ermöglichte es Hodgkin, Huxley und Katz (1952) und Hodgkin und Huxley (1952 a-d), die Grundlagen der Entstehung und Fortleitung von Nervenimpulsen im Tintenfischaxon aufzuklären. Im Prinzip handelt es sich beim Voltage Clamp um eine elektronische Schaltung, die es ermöglicht, Nervenzellen bestimmte Membranpotentiale, bzw. stufenweise Veränderungen des Potentials, aufzuprägen und die dazu nötigen über die Zellmembran abfließenden Ströme zu messen.

Mit einer Mikroelektrode wird das Membranpotential in der Zelle (gegenüber Masse = Ringer-Bad) gemessen

und an den Eingang eines invertierenden Differenzverstärkers mit sehr hohem Verstärkungsfaktor (5ooo - 1o ooo) angeschlossen (siehe Abb.3). Gleichzeitig wird an dem Eingang des Verstärkers ein bestimmtes Potential (der Soll-Wert, also z.B. das Ruhepotential) vorgegeben, sodaß der Verstärker genau in Null-Stellung ist, wenn das gemessene Potential dem Sollwert entspricht. Weicht nun das gemessene Potential nur um einen ganz geringen Betrag von dem vorgegebenen Wert ab, so wird am Ausgang des Verstärkers ein um einen Faktor von 5 - 1o ooo verstärkter Strom in der Gegenrichtung entstehen. Dieser wird durch die Strom-Injektions-Elektrode in die Zelle geleitet und wird die im Entstehen begriffene Spannungsauslenkung sehr schnell (in weniger als 1oo µsec) kompensieren. Auf diese Weise wird jede mögliche Abweichung des Membranpotentials sofort, bevor sie eigentlich entstehen kann, verhindert. Der Zelle kann also, durch Einstellung des Soll-Werts(Spannungskommando, Abb. 3), jedes beliebige Membranpotential, auch jede beliebige Folge von Membranpotentialen, aufgeprägt werden.

Wenn der Zelle verschiedene Spannungsschritte aufgeprägt werden, ändern die gemessenen Ströme in nichtlinearer Weise ihre Größe, ihre Richtung und auch ihren Zeitverlauf. Da das Potential zu beiden Seiten der Zellmembran konstant gehalten wird, muß, nach dem Ohm'schen Gesetz, der zeitlichen Änderung des über den Widerstand der Zellmembran abfließenden Stromes (= Membranpotential:

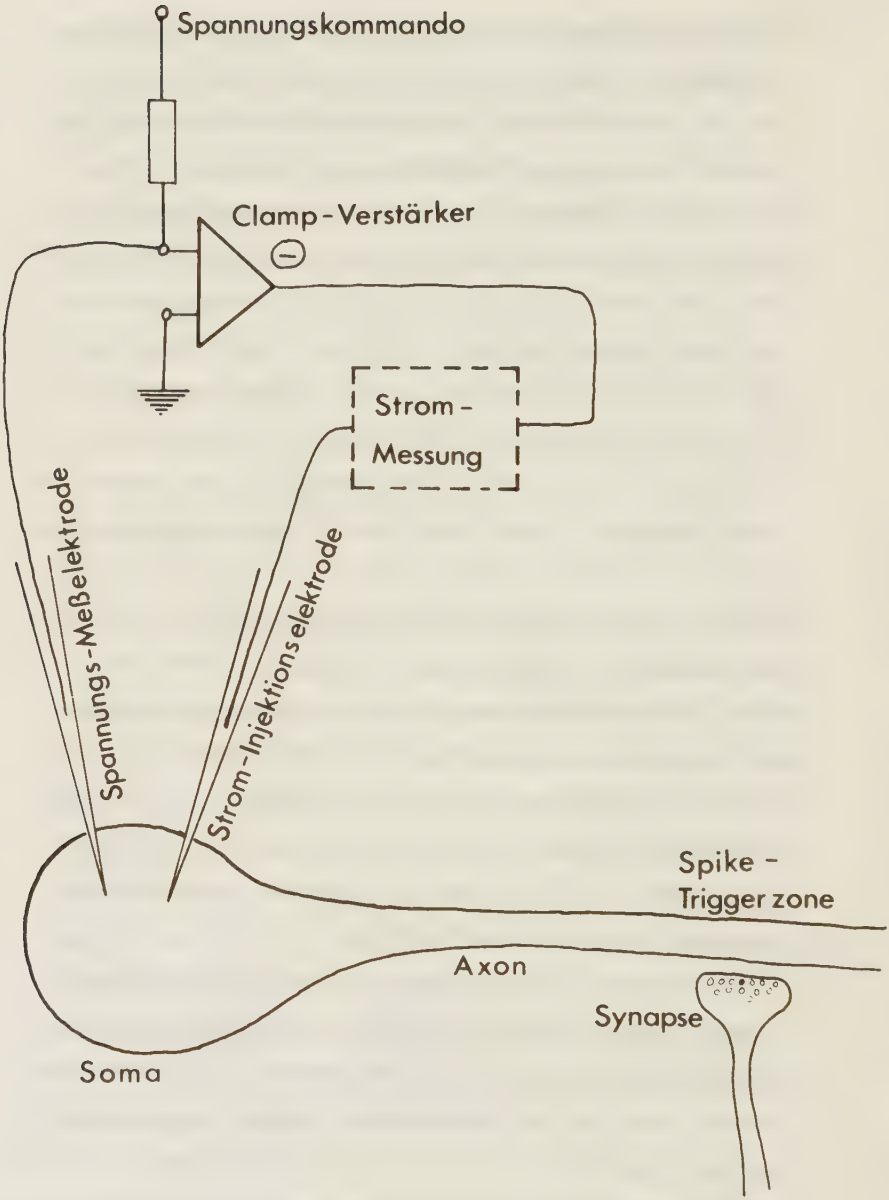


Abb. 3. Grundprinzip der Voltage-Clamp-Schaltung.

Membranwiderstand) eine zeitliche Änderung des Membranwiderstandes entsprechen. Wenn man also von K^+- und Na^+-Strömen spricht, liegt dem immer eine zeit- und spannungsabhängige Änderung der Leitfähigkeit der Membran für die betreffenden Ionen zugrunde.

Das besondere Problem des Voltage Clamp ist nun, daß bei einem fortgeleiteten Aktionspotential nicht nur die Ströme an einem bestimmten Ort sich laufend ändern, sondern auch an verschiedenen Orten der Membran, wo das Potential verschieden ist, andere Ströme fließen. Genaue Aufschlüsse über die Leitwertänderungen in der Membran sind jedoch nur möglich, wenn man die Ströme über einem homogenen, d.h. isopotentialen Membranstück mißt.

Das Tintenfischaxon wurde durch das Einführen eines leitenden Drahtes ins Zellplasma zu einem isopotentialen Stück Membran. Dadurch wurde die longitudinale Fortleitung des Impulses ausgeschaltet, oder, genauer gesagt, sie wurde so schnell gemacht, daß die Leitwertänderungen an verschiedenen Orten der Membran synchron verlaufen. Dadurch wurde erreicht, daß die Ströme nur noch als eine Funktion des Potentials und der Zeit erscheinen.

Beim Voltage Clamp des Zellsoma ist dieses Problem schwieriger zu lösen. Man kann zwar annehmen, daß das Zellsoma isopotential ist, aber ein Spannungsschritt im Soma wird sich auch ins Axon ausbreiten, und der Zeitverlauf der ins Axon abfließenden Ströme wird von den

jeweiligen Kabeleigenschaften des Axons bestimmt. Außerdem wird sich bei delolarisierenden Spannungsschritten wiederum der Membranwiderstand des Axons ändern; bei großen depolarisierenden Spannungsschritten werden im Axon auch Spikes ausgelöst, da die Voltage-Clamp-Elektronik wegen des Längswiderstandes zwischen Soma und Axon nur das Potential im Zellsoma konstant halten kann.

In Abb. 4 ist eine solche Ableitung zu sehen. Von verschiedenen Membranpotentialwerten ausgehend wurde der Zelle ein Spannungsschritt auf -28,5 mV aufgeprägt. Man sieht, daß je nach Höhe des Ausgangspotentials ein kleinerer oder größerer Auswärtsstrom fließt. Gleichzeitig werden im Axon Aktionspotentiale ausgelöst, die sich als die mit Pfeilen gekennzeichneten Artefakte bemerkbar machen.

B. Patch Clamp

Diese Störungen in der Strommessung werden durch die Patch Clamp-Technik vermieden. Diese spezielle Voltage Clamp-Technik wurde von Neher und Lux entwickelt (s. Neher und Lux, 1969). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apparaturen sind die gleichen, die von Neher und Lux (1972) benutzt wurden. Dabei wird, zusätzlich zu den zwei intrazellulären Mikroelektroden, eine speziell konstruierte Glaspipette auf die Zelle aufgesetzt, deren Spitze einen Durchmesser von ca. 5o µ hat. Diese

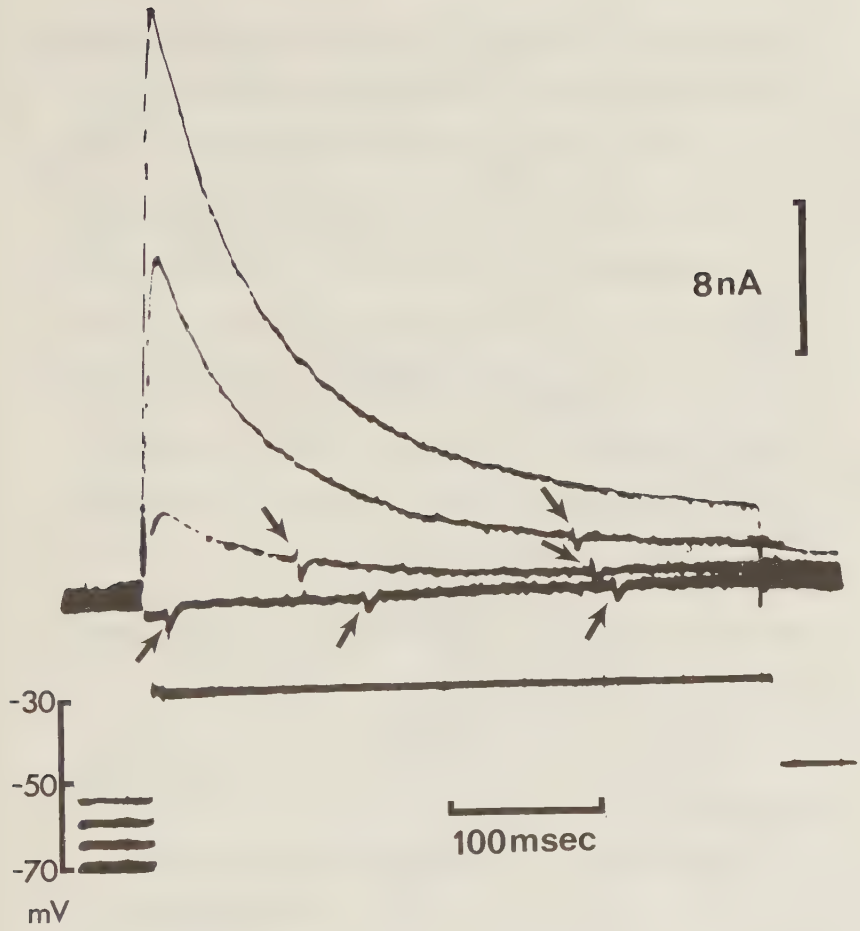


Abb. 4. Beispiel einer Voltage-Clamp-Messung des schnellen K^+-Stromes; Spannungsverlauf unten, Strommessung oben, jeweils 4 übereinanderprojizierte Ableitungen. Ausgehend von einem Membranpotential von - 55, - 60, - 65, bzw. - 70 mV wurde der Zelle ein Spannungssprung auf - 28,5 mV aufgeprägt, der dadurch hervorgerufene schnelle K^+-Strom betrug 0, 5, 18, bzw. 30 nA (Auswärtsstrom nach oben).

Pipette hat in ihrer Spitze ebenfalls eine Spannungs-Meßelektrode und eine Strom-Injektions-Elektrode, die an eine eigene Voltage Clamp-Elektronik angeschlossen sind (siehe Abb. 6). Durch diese zweite Voltage Clamp-Schleife wird das Potential an der Spitze der Pipette auf Masse gehalten. (s. Neher und Lux, 1969). Durch geeignete Wahl des Verstärkungsfaktors kann der effektive Widerstand, den der durch das runde Membranareal in die Pipette fließende Strom vorfindet (R_2), beliebig variiert werden. Er wird auf genau die Größe gebracht, die dem Widerstand der Ringerlösung über jedem anderen gleich großen Membranareal entspricht. Dadurch wird, wie bei einer balancierten Wheatstone'schen Brücke, der über den Widerstand R_5 unter dem Rand der Pipette abfließende Strom auf 0 gehalten.

$R_1 : R_2 = R_3 : R_4$

Der nach einem V.C.-Puls* im Soma ins Ringer-Bad abfließende Strom wird also durch die Pipette überhaupt nicht beeinflußt. Der in der Pipette gemessene Strom bei Voltage Clamp-Pulsen im Soma repräsentiert also mit sehr guter Auflösung die Permeabilität des Membranstükkes unter der Pipette. Axonspikes werden fast ganz von der Voltage Clamp-Elektronik des Gesamtzellclamps kompensiert und sind lediglich als kleine, schnelle Auslenkungen in der Stromspur zu sehen (Abb. 5), die die Messungen nicht stören, sondern im Gegenteil sehr nützlich sein können, wie unten gezeigt werden wird. In Abb. 7 sind zum Vergleich die in der Pipette gemessenen

*(V.C. = Voltage Clamp)

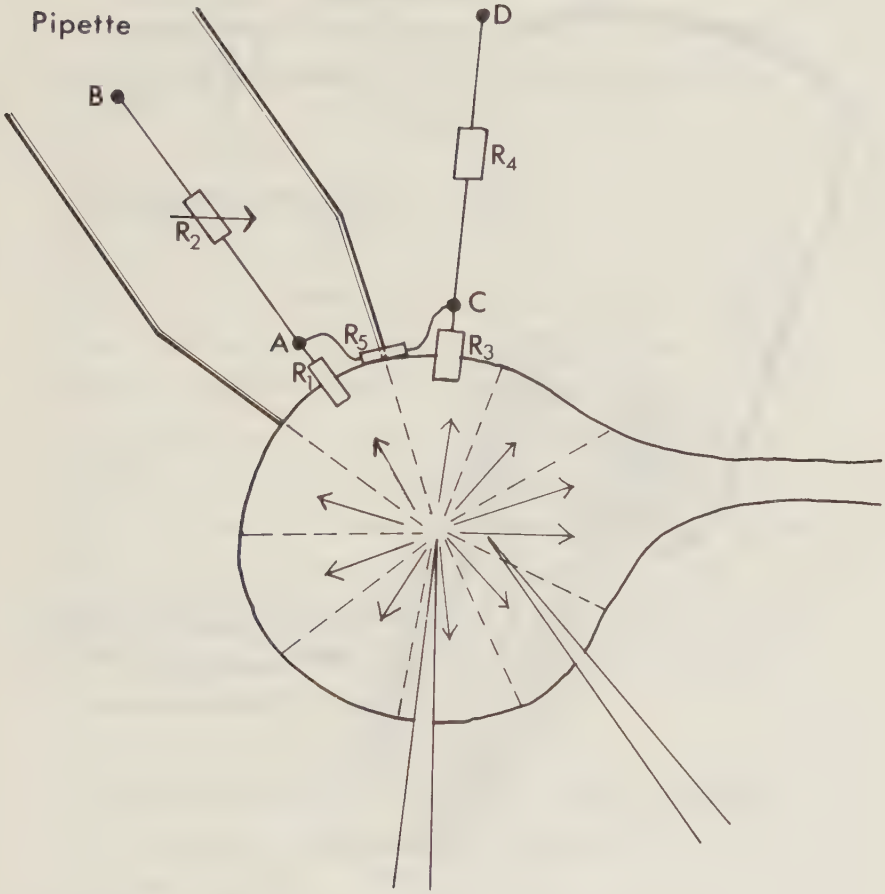


Abb. 5. Strommessung in der Pipette, vereinfachtes Blockschaltbild. R_1 = Membranwiderstand unter der Pipette; R_2 = effektiver Widerstand in der Pipette (beliebig variierbar durch Einstellung des Verstärkungsfaktors) vom Punkt A = unmittelbar über der Zellmembran bis Punkt B = . R_3 = Membranwiderstand vom Rest der Zelle; R_4 = Widerstand des Ringerbades außerhalb der Pipette. Punkt C ist ein Punkt unmittelbar über der Zellmembran außerhalb der Pipette, Punkt B und Punkt D sind geerdet. (Nach Neher und Lux, 1969)

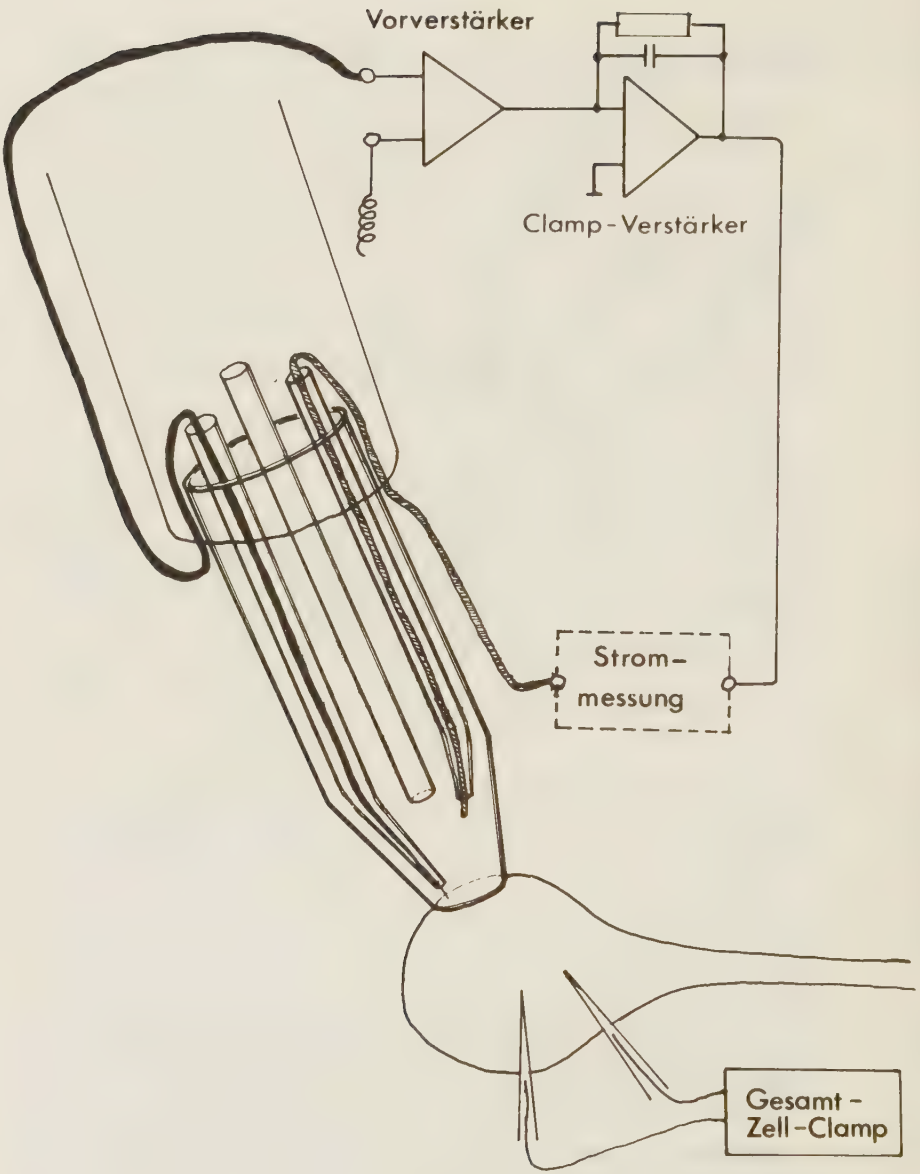


Abb. 6. Prinzip der Pipetten-Clamp-Schaltung.

Ströme den in der Erdleitung gemessenen, über die gesamte Zelle abfließenden Strömen gegenübergestellt.

C. Konstruktion der Pipette

Die V.C.-Ströme wurden mit einer Modifikation der von Neher und Lux benutzten Pipette gemessen (Abb. 6). Der Gang der Konstruktion war folgendermaßen:

Die Spitze der Pipette wird durch hohe Zugkraft sehr kurz gezogen und mit der De Fonbrune Mikroforge glatt auf etwa 5o μ Durchmesser abgebrochen. Durch ganz kurzes Erhitzen werden die Bruchkanten etwas abgerundet. In diese Pipette werden nun eingebaut

1. eine Spannungs-Meßelektrode, die das Potential an der Spitze der Pipette mißt;
2. eine Strom-Injektions-Elektrode;
3. ein Glasröhrchen für Luftzufuhr, um die Füllung der Pipettenspitze mit Ringerlösung kontrollieren zu können.

Dazu werden die Spitzen von drei dünnen Glas-Kapillaren so abgebrochen und etwas gebogen, daß später die Spitze der längsten Kapillare, der Spannungs-Meßelektrode, genau in die Spitze der Pipette paßt. Sie hat eine Öffnung von ca. 1o - 2o μ. Ein 0,1 mm starker Silberdraht wird in Salpetersäure elektrolytisch so zugespitzt, daß er genau in das Glasröhrchen paßt und gerade noch als Spannungs-Meßelektrode aus der Spitze herausragt. Er

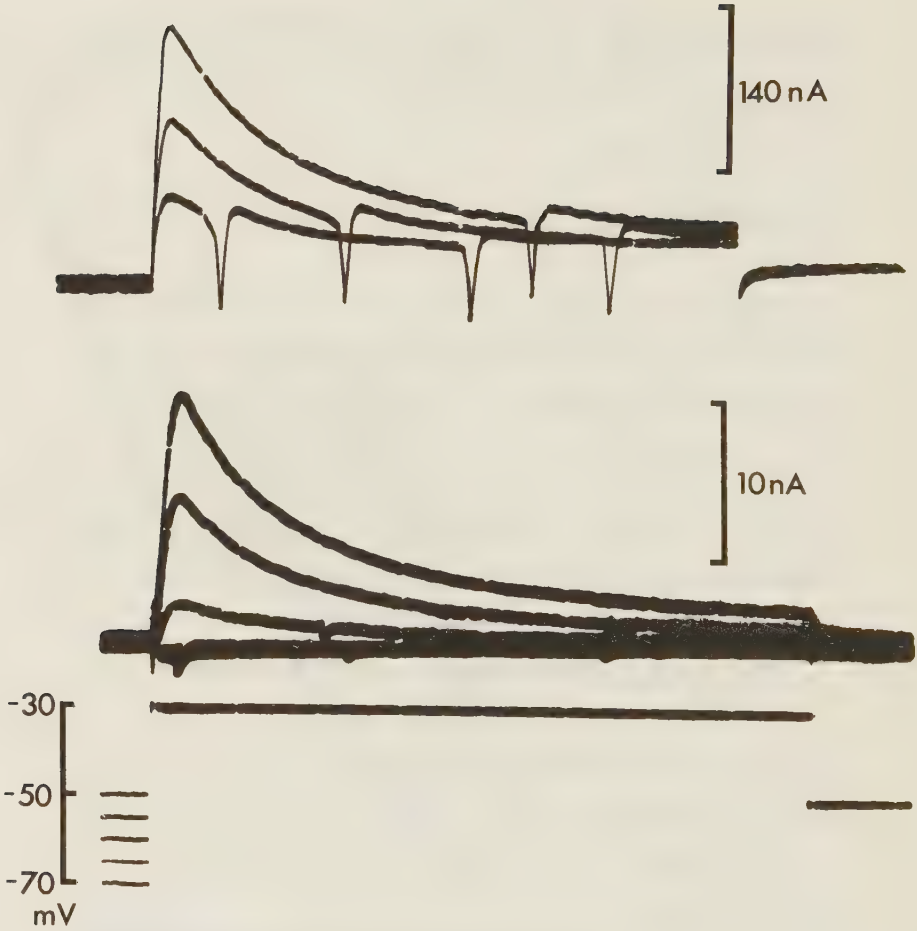


Abb. 7. Oben: Stromableitungen von der gesamten Zelle (in der Erdleitung des Ringerbades), bei einem Testpuls auf - 30 mV, ausgehend von einem Membranpotential von - 60, - 65, bzw. - 70 mV. Unten: Stromableitung in der Pipette, Ausgangspotential - 50, - 55(identische Stromspuren), - 60, - 65, - 70 mV.

wird in das Röhrchen eingeführt und dadurch fixiert, daß der obere Teil des Röhrchens mit Siegelwachs gefüllt wird. Auf die gleiche Weise wird die Strom-Injektions-Elektrode angefertigt, deren Spitze etwas weiter ist, und die ebenfalls fast bis zur Spitze der Pipette hinunterreicht. Schließlich werden die beiden Röhrchen mit dem dritten Röhrchen, das der Luftzufuhr dient, zusammengeklebt und vorsichtig an der Mikroforge in die Spitze der Pipette hinabgelassen. Wenn die richtige Position erreicht ist, d.h. wenn das Ende des Spannungs-Meßdrahtes nur wenige μ von der Öffnung der Pipette entfernt ist, wird das Ganze dadurch fixiert, daß die Pipette mit Siegelwachs gefüllt wird. Bei vorsichtigem Erhitzen fließt das Siegelwachs fast bis zur Spitze der Pipette, so daß die ganze Konstruktion recht stabil wird.

Die beiden Silberdrähte werden gut chloriert. Die aus dem hinteren Ende der Pipette herausragenden Enden der Röhrchen werden durch einen elastischen Gummischlauch geschützt, dessen hinteres Ende verschlossen wird. Man kann nun, da der Gummischlauch durch das Luftröhrchen mit der Spitze der Pipette verbunden ist, während des Experimentes die in die Pipettenspitze eindringende Flüssigkeitsmenge genau regulieren. Die Ringerlösung wird soweit in die Pipette eingesogen, daß sie guten Kontakt mit der Stromelektrode hat.

Neben ihrer Haltbarkeit hat diese Konstruktion der Pipette folgende Vorteile: nur die äußerste Spitze des

Spannungs-Meßdrahtes liegt frei; dadurch werden Meßfehler, die durch einen Spannungsabfall innerhalb des Pipettenhalses auftreten könnten, ausgeschaltet. Die kapazitive Kopplung zwischen Strom- und Spannungselektrode wird auf das geringst mögliche Maß reduziert, da 1. die Menge der mit der Stromelektrode in Kontakt stehenden (also mitschwingenden) Ringerlösung so gering wie möglich gehalten wird, und 2. an allen Stellen, außer ganz vorn an der Spitze, ein Medium mit hoher Dielektrizitätskonstante (Luft bzw. Siegelwachs) den Spannungs-Meßdraht umgibt.

D. Schaltplan

Der Schaltplan ist in Abb. 8 in einem Blockschaltbild wiedergegeben. Er wurde von Dr. E. Neher entworfen; die Grundlagen sind ausführlich bei Neher (197o) diskutiert.

Das in der Zelle mit der Mikroelektrode gemessene Spannungssignal (gegenüber Ringer-Bad = Masse) gelangt an den FET-Vorv erstärker (Ancom 15 B2), der direkt auf den Mikromanipulator montiert ist, um die Leitungen möglichst kurz zu halten. Der Vorverstärker hat einen Eingangswiderstand von $1o^{11}$ Ohm und eine variierbare Kapazitätsneutralisation. Das 1ofach verstärkte Signal wird auf dem Oszilloskop und dem Papierschreiber dargestellt. Gleichzeitig gelangt es an den invertierenden

Eingang des Clamp-Verstärkers, wo auch das Kommandosignal hinzuaddiert wird. Der Clamp-Verstärker hat einen Verstärkungsfaktor von ca. 5 - 1o ooo. Von seinem Ausgang wird das Signal in die Strom-Injektions-Elektrode zurückgeführt. Die Strommessung erfolgt entweder mit einem floating Amplifier, der von Masse getrennt ist, und die Spannungsschwankungen des Verstärkerausgangs

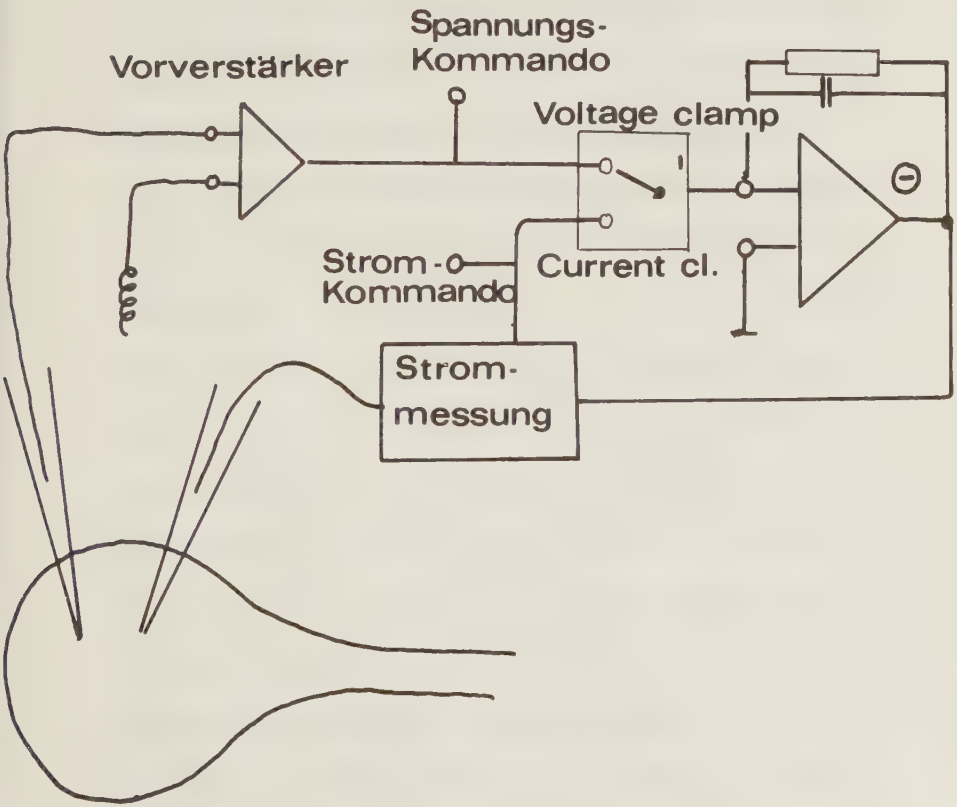


Abb. 8. Blockschaltbild der Soma-Clamp-Schleife.

mitmacht, oder über einen Operationsverstärker in der Erdleitung des Ringer-Bades.

Durch einen elektronischen Schalter kann von Voltage-Clamp auf Current-Clamp umgeschaltet werden. Im Current-Clamp ist das Membranpotential frei beweglich, es können jedoch beliebig große Strompulse, deren Größe durch die Feedback-Schleife konstant gehalten wird, in die Zelle injiziert werden.

Der Current-Clamp wurde dazu benutzt, die Reaktion der Zelle auf synaptische Erregung und auf Injektion von Strompulsen bei verschiedenen vorgegebenen Membranpotentialen zu messen.

Die Pipetten-Clamp-Schleife ist im Prinzip genauso aufgebaut, nur ist im invertierenden Verstärker eine Bandbreitenbegrenzung (über 3 kH) eingebaut.

IV. DIE EIGENSCHAFTEN DER NERVENZELLEN VON HELIX POMATIA

1. Morphologie

Das Gehirn von Helix pomatia besteht aus einem Ring von Ganglien, der den Oesophagus umgibt. Jedes Ganglion ist von einer Bindegewebsschicht umgeben. Die Ganglien sind miteinander verwachsen, sodaß man makroskopisch nur das Oberschlundganglion und das Unterschlundganglion unterscheiden kann, die durch zwei dicke Konnektive rechts und links des Oesophagus verbunden sind. Ein Ganglion besteht aus einem Bündel von einigen hundert Zellen, von denen einige bis 300 µ im Durchmesser sind. Die Zellen sind annähernd kugelförmig und liegen in mehreren Schichten an der Oberfläche des Ganglions. Sie haben am Zellsoma keine dendritischen Fortsätze; die Axonfortsätze der Zellen sind zur Mitte des Ganglions hin orientiert, wo sie ein sehr dichtes und weitverzweigtes Geflecht bilden, das Neuropil. Die Axone sind im Neuropil vielfach verzweigt. Sie haben zahlreiche dendritenähnliche Fortsätze. Auch Endigungen, die Vesikel enthalten, sind sehr zahlreich. Die Synapsen scheinen jedoch in Mollusken morphologisch nicht so differenziert

zu sein, wie in anderen Tierstämmen, postsynaptische Membranverdickungen und synaptische Spalte wurden nur sehr selten beobachtet. Man kann daher die Synapsen nicht ganz genau lokalisieren. Wie man aus den Untersuchungen von Tauc (s. Tauc, 1962) weiß, sind die Synapsen in der Meeresschnecke Aplysia recht weit vom Soma entfernt, wahrscheinlich nicht weniger als 1 mm. In etwa gleicher Entfernung vom Zellsoma wie die Synapsen liegt im Axon die sog. Spike-Trigger-Zone. Das ist die Stelle, wo die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials am niedrigsten liegt. Aktionspotentiale, die durch synaptische Erregung in dieser Trigger-Zone initiiert werden, werden in jedem Falle zur Peripherie hin fortgeleitet; die Fortleitung ins Soma findet nicht immer statt, sondern hängt von der jeweiligen Erregbarkeit und dem Membranpotential des Somas ab. Synaptische Übertragung ist also auch durchaus ohne das Soma möglich. Die Aktionspotential-Schwelle steigt von der Spike-Trigger-Zone zum Soma hin stetig an und ist am höchsten im Zellsoma selbst. Welche Rolle das Soma in der synaptischen Integration spielt, ist unklar.

2. Membraneigenschaften

Die Nervenzellen von Schnecken unterscheiden sich in ihren elektrischen Eigenschaften zum Teil ganz erheblich von Nervenzellen von Wirbeltieren. Um den Rahmen

abzustecken für die Interpretation der Resultate möchte ich kurz die elektrischen Membraneigenschaften der untersuchten Zellen beschreiben.

Da die Eigenschaften von Mollusken-Nervenzellen hauptsächlich an anderen Präparationen erforscht wurden, war es oft nicht zu vermeiden, auf Resultate zurückzugreifen, die an Aplysia oder anderen Mollusken gewonnen wurden. Besonders die Vorgänge im Axon und an den Synapsen sind bei Aplysia wesentlich genauer untersucht. Ich glaube aber nicht, daß sich aus den Analogieschlüssen irgendwelche Fehler ergeben, weil bisher kaum grundlegende Unterschiede zwischen den Nervenzellen von Helix pomatia und Aplysia gefunden wurden.

Die spezifische Kapazität wurde von Neher mit Hilfe von Ramp-Voltage-Clamp-Pulsen gemessen. Sie beträgt 4,1 $\mu F/cm^2$ Membranfläche unter der Pipette. Da bei dieser Messung nur der kapazitive Strom an der Membran unter der Pipette gemessen wurde, konnten Fehler durch Ausbreitung des Stromes ins Axon nicht auftreten. Allerdings sind bei der Größenangabe der spezifischen Kapazität die Invaginationen in der Zellmambran nicht berücksichtigt, die bei Aplysia (Coggeshall, 1967) bei afrikanischen Landschnecken (Amoroso et al.) und bei Anisodoris (Mirolli und Talbot, 1972) gefunden wurden. Diese Invaginationen erhöhen die Zelloberfläche um einen Faktor von 8 für Aplysia (Chalazonitis und Arvanitaki, 1966) bzw. 7,5 für Anisodoris (Mirolli und Tal-

bot, 1972). Diese Invaginationen stellen wahrscheinlich keine Diffusionsbarrieren für kleine Ionen dar (Gorman und Mirolli, 1973). Sie müssen bei der Berechnung der spezifischen Kapazität berücksichtigt werden. Gorman und Mirolli fanden bei Anisodoris durch Analyse der membrane transients unter Berücksichtigung der Morphologie der Zellmembran eine spezifische Kapazität von genau 1 uF/cm^2. Da dieser Wert bei fast allen biologischen Membranen vorkommt, kann man annehmen, daß die spezifische Kapazität auvh bei Mollusken generell in der Größenordnung von 1 uF/cm^2 liegt, obwohl von verschiedenen Untersuchern höhere Werte gefunden wurden. Das ist aber teilweise darauf zurückzuführen, daß die Ausbreitung des Stromes ins Axon nicht genügend berücksichtigt wurde. Eine spezifische Kapazität von weniger als 1 µF/cm^2 wäre aus theoretischen Überlegungen (Cole, 1968) recht unwehrscheinlich, so daß man aus der Messung von 4,1 µF/cm^2 von Neher in erster Neher in erster Näherung schließen kann, daß die Invaginationen die Oberfläche der Membran in Helix pomatia um einen Faktor von etwa 4 vergrößern.

Die Leckleitfähigkeit der Membran beträgt nach Neher (1971) 1,9 ($\pm$ o,6) x $1o^{-4}$ Ohm^{-1} (gemessen mit hyperpolarisierenden Voltage-Clamp-Pulsen als Leckstrom in der Pipette). Das würde unter Berücksichtigung der Invaginationen einen spezifischen Widerstand der Membran von ca. 2 x $1o^4$ Ohm cm^2 ergeben. Ähnliche Werte wurden auch von Meves (1968) gefunden. Dieser Wert

liegt wesentlich höher als bei anderen Tierarten, wo fast immer ein spezifischer Membranwiderstand in der gleichen Größenordnung wie beim Tintenfischaxon (Cole und Hodgkin, 1939), nämlich 1oo Ohm cm^2 gefunden wurden. Sowohl die Zeitkonstante als auch die Längskonstante der Membran sind deshalb in Schnecken größer als in den meisten anderen Präparationen.

3. Die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellen

Die Längskonstante λ ist bei Mollusken im allgemeinen sehr groß. Direkt gemessen wurde sie nur im Riesenneuron von Aplysia (Tauc, 1962). Bei Anisodoris ist sie besonders groß (ca. 1 cm) wegen des extrem hohen Membranwiderstandes. Beim Riesenneuron von Aplysia liegt die Längskonstante in der Größenordnung von 1 - 2mm. Jedoch beträgt dort der Radius einige u, während er bei Helix pomatia wahrscheinlich nicht mehr als 1 µ ist (Schlote, 1955). Da λ proportional der Wurzel des Radius ist, wäre die Längskonstante also bei Helix, bei sonst gleichen Gegebenheiten weniger als halb so groß. Außerdem sind noch die radialen Einstülpungen der Membran ins Lumen des Axons zu berücksichtigen. Diese sind im Helix ausgeprägter als in Aplysia, was die erwartete Längskonstante noch etwas kleiner macht.

Mirolli und Talbot haben an Anisodoris genaue anatomische Messungen mit physiologischen kombiniert. Sie

haben gefunden, daß das Verhältnis zwischen dem Umfang des Axons (P) und dem Querschmitt (A) immer gleich bleibt, auch wenn der Radius des Axons variiert. Da

$$\lambda = A/P \cdot \sqrt{R_m/R_i}$$

würde sich also λ bei den oft beobachteten Erweiterungen des Axons und bei Streckung des Axons nicht ändern. Da die Zellen von Anisosoris etwa genau so groß sind wie die von mir bei Helix pomatia untersuchten Zellen und bei Helix ähnliche radiale Einstülpungen beschrieben wurden (Schlote), könnte man, für eine grobe Abschätzung, von ähnlichen anatomischen Verhältnissen in den beiden Präparationen ausgehen. Wenn man nun den wesentlich kleineren spezifischen Membranwiderstand von Helix in die Formel für die Längskonstante von Anisodoris einsetzt ($\lambda = A/P \cdot \sqrt{R_m/R_i}$, s. Mirolli und Talbot) erhält man eine Längskonstante von etwa 1,3 mm. Dieser Wert wurde beim Abschätzen der Größenordnungen zu Grunde gelegt.

Die Membranzeitkonstante läßt sich ebenfalls nur mit begrenzter Genauigkeit bestimmen. Da die Hyperpolarisation bei einem im Soma applizierten Strompuls nicht uniform verteilt ist, sondern im Axon exponentiell abfällt, ist der Zeitverlauf des Passiven Abfalls einer Hyperpolarisation des Zellsomas schneller als bei einer initial uniformen Verteilung. Auch hängt er sehr stark von ς ab (ς = steady state axonal input conductance/ soma G_m). Auch die letzte Phase des Abfalls eines EPSP gibt kein gutes Maß für τ_m, obwohl da die Spannung relativ homogen verteilt ist, da die Abfallsgeschwindig-

keit sehr stark von dem elektrotonischen Abstand der Synapse abhängt (Rall, 1967).

Eine relativ genaue Möglichkeit τ_m zu bestimmen, ist der sog. LRTV plot (Rall, 1960), ein Plot von log ($\sqrt{t} \cdot dV/dt$) gegen t, mit dem sich τ_m mit großer Genauigkeit ablesen läßt, vorausgesetzt, daß der Faktor $S \geq 2$ ist. Das ist bei Helix der Fall (Lux, unpublizierte Beobachtungen, auch Gorman und Mirolli, 1972; $S = 5$ für Anisodoris).

Die mit Hilfe von LRTV plôts nach Rall aus dem Potentialverlauf bei depolarisierenden und hyperpolarisierenden Strompulsen bestimmte Membranzeitkonstante betrug ca. 20 msec, in einigen Fällen auch wesentlich mehr.

Aus der Messung von Membrankapazität und -widerstand unter der Pipette läßt sich ebenfalls die Zeitkonstante berechnen ($\tau_m = R_m \times C_m$). Bei einer Serie von Messungen, die Neher (1971) machte, betrug der Durchschnittswert des Membranwiderstands $10^4/1{,}9 \pm 0{,}6$ Ohm cm^2 und die Membrankapazität $4{,}1 \pm 0{,}8$ $\mu F/cm^2$, woraus sich eine Membranzeitkonstante von ca. 20 msec berechnen läßt. In dieser Größenordnung liegt normalerweise der Wert der Zeitkonstanten in den großen Zellen des Visceralganglions der Schnecke, in manchen Zellen werden jedoch auch wesentlich längere Zeitkonstanten, bis über 100 msec, gefunden.

4. Synaptische Potentiale

Die durch einen synaptischen Reiz hervorgerufene Potentialauslenkung hängt vom Membranpotential der Zelle ab. In dem in Abb. 9A gezeigten Experiment wurde die Zelle in Abständen von 1o sec. durch Reizung des Analnerven erregt. Das postsynaptische Membranpotential wurde durch Injektion von konstanten Strompulsen ins Zellsoma variiert. Man sieht, daß die Amplitude der EPSPs mit zunehmender Hyperpolarisation immer größer wird. Aus ihrer Spannungsabhängigkeit ergibt sich ein Umkehrpotential von ungefähr +1o mV. Diesen Wert würde man für das Umkehrpotential einer ACh-Synapse, die nicht zu weit vom Soma entfernt ist, erwarten (s. Gerschenfeld, 1972). Wenn die Synapse elekrotonisch weiter vom Soma entfernt wäre, würde man eine weit geringere Spannungsabhängigkeit und ein viel positiveres scheinbares Umkehrpotential erwarten. Aus der Spannungsabhängigkeit der EPSPs läßt sich die obere Grenze des elektrotonischen Abstandes der Synapsen vom Soma abschätzen.

Der elektrotonische Abstand liegt auf jeden Fall unter 1 λ, da bei einer Synapse in o,8 λ Abstand z.B. eine Hyperpolarisation des Somas um 2o% nur noch eine Vergrößerung des Synaptischen driving potential um 8 % bewirken würde (s. Rall et al., 1967), so daß die beobachtete Größenzunahme der EPSPs nur noch sehr schwer

zu erklären wäre.

Der Anstieg und der Abfall der EPSPs ist sehr langsam (Abb. 9A,B). Die Geschwindigkeit des Abfalls eines EPSPs ist ein sehr sensitives Maß für den elektrotonischen Abstand der Synapse vom Soma und läßt sich für eine Abschätzung seiner unteren Grenze verwenden. Wenn die Leitwerterhöhung am Ort der Synapse den gleichen Zeitverlauf hätte wie im Motoneuron der Katze,könnte man aus dem Vergleich mit Ralls Berechnungen (1962) schließen, daß der elektotonische Abstand Z in der Grössenordnung von 1-2 liegt. Selbst wenn man berücksichtigt, daß die synaptischen Vorgänge bei Schnecken sicher viel langsamer ablaufen und der Zeitverlauf der Transmitterwirkung nicht einen so steilen Anstieg und Abfall hat wie bei Vertebraten (s. Katz und Miledi, 1966), so kann man doch annehmen, daß die Synapsen wahrscheinlich nicht weniger als o,3 λ vom Soma entfernt sind. Man kann also als grobe Schätzung davon ausgehen, daß Synapsen und Spike-Trigger-Zone sich im Axon in einem Abstand von o,3-1 λ vom Soma entfernt liegen.

Fußnote: Als elektrotonischen Abstand Z definiert man die räumliche Entfernung (X) in Einheiten der Längskonsonanten $Z = X/\lambda$. X ist die Entfernung in mm, bei der - wenn das Axon für längere Zeit (steady state) an einem Punkt X = 0 durch Strominjektion polarisiert wird - die Polarisation, (die ja exponentiell mit der Entfernung abnimmt) nur noch 1/e der Spannungsauslenkung am Punkt X = 0 beträgt.

Ein starker erregender synaptischer Reiz löst bei einem Membranpotential von -5o mV normalerweise ein Aktionspotential im Zellsoma aus. Bei Hyperpolarisation des Somas verschwindet der Spike und man sieht an seiner Stelle eine kleinere depolarisierende Potentialauslenkung, den Axonspike (Abb. 9A,B), dessen aktive Ausbreitung ins Soma blockiert wurde. Wenn man die Zelle noch etwas weiter hyperpolarisiert, wird schließlich auch der Axonspike blockiert und man sieht nur noch die EPSPs.

EPSPs und Axon-Spikes haben in ihrer Form gewisse Ähnlichkeiten. Bei genauerer Betrachtung kann man sie jedoch sehr leicht unterscheiden: 1. Die Axonspikes werden bei zunehmender Hyperpolarisation nicht größer, sondern bleiben gleich groß, bis sie bei starker Hyperpolarisation schließlich blockiert werden; 2. sie sind in ihrer Form wesentlich konstanter, auch bei oft wiederholter Reizung; 3. sie haben einen steileren Anstieg.

In Abb. 9C ist in einer anderen Zelle der Unterschied zwischen Axonspikes und EPSPs noch einmal mit genauerer Auflösung dargestellt.

5. Pharmakologie der Synapsen

Die Pharmakologie der Synapsen wurde bei Mollusken recht gründlich erforscht (s. Tauc, 1967; Gerschenfeld, 1972; Kehoe, 1972). Das wurde dadurch erleichtert, daß

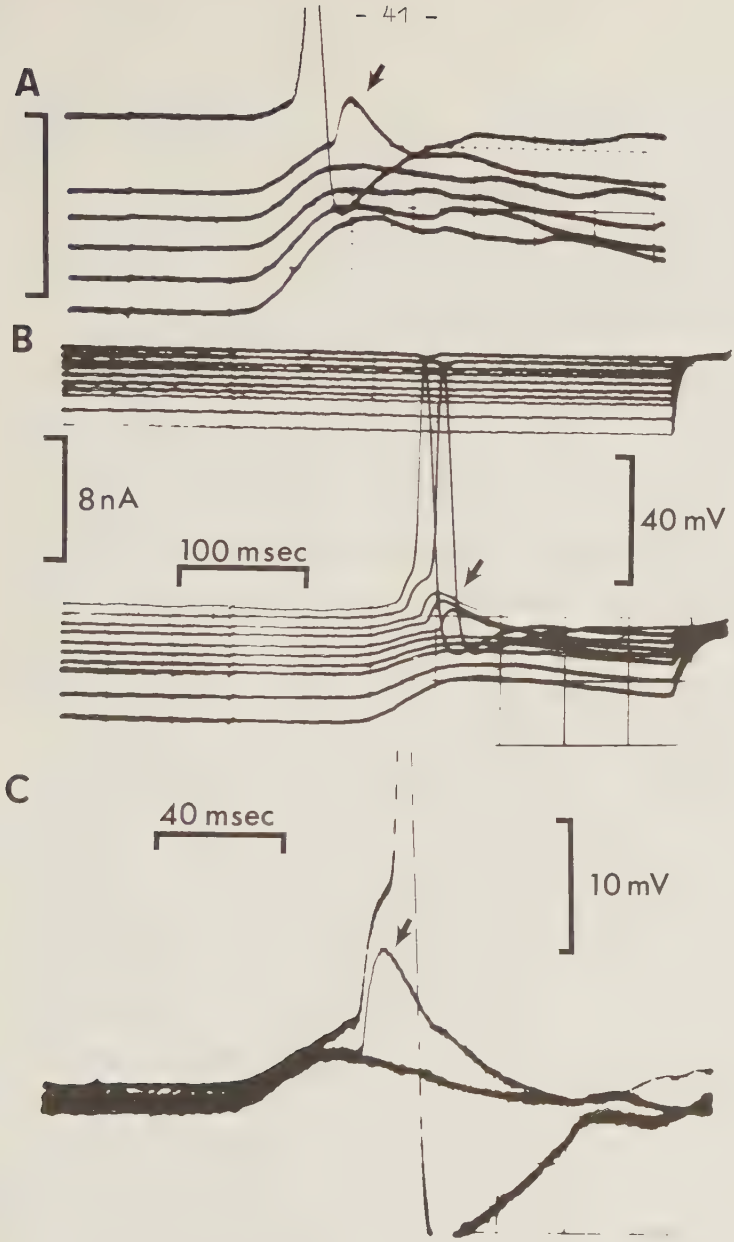


Abb. 9. EPSPs und Axon-Spikes (Pfeile).

zumindest auch Teile des Somas Rezeptoren für Transmitter zu haben scheinen und keine Diffusionsbarriere zwischen der Zelloberfläche und iontophoretisch applizierten (oder einfach der das Ganglion umgebenden Lösung) zugesetzten) Transmittern besteht. Ein weiterer Vorteil, den das Gehirn von Mollusken für das Studium der Physiologie und Pharmakologie der Synapsen bietet, ist der, daß man die Zusammensetzung des extrazellulären Mediums unter Kontrolle hat und beliebig variieren kann.

Bei der Anwendung dieser Methoden fand man heraus, daß es oft mehrere Rezeptoren für einen Transmitter gibt, die auch alle an der gleichen Nervenzelle vorkommen können (Kehoe, 1972). Es gibt z.B. Acetylcholin-Rezeptoren, die die Permeabilität für Cl^- erhöhen. Wenn die intrazelluläre Cl^--Konzentration hoch ist, so ist das postsynaptische Potential depolarisierend (D-Zellen), wenn die intrazelluläre Cl^--Konzentration niedrig ist, ist das postsynaptische Potential hyperpolarisierend (Kerkut und Walker, 1962). Andere Acetylcholin-Rezeptoren führen zu einer Erhöhung der Na^+- und K^+-Permeabilität und somit zu einer Depolarisation. Es wurden weiterhin Acetylcholin-Rezeptoren beschrieben, die eine langsame Erhöhung der Membranpermeabilität für Na^+-Ionen bewirken sollen, die aber zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen, da der Eintritt der Na-Ionen in die Zelle zur Aktivierung der elektrogenen Na^+-Pumpe führt (Kerkut, Brown und Walker, 1969). Auch Serotonin (5-H)(Gerschenfeld und Stefani, 1968) und Dopamin (Gerschenfeld und Tauc, 1964; Sweeney, 1963)

werden als mögliche synaptische Transmitter in Mollusken diskutiert.

Levithan und Tauc (1972) haben die topographische Verteilung der Acetylcholin-Rezeptoren untersucht und fanden, daß die äußere Oberfläche der Zellen für Transmitter beim Riesenneuron von Cryptomphallus aspersa intensiv ist. Auch Stefani und Gerschenfeld (1962) haben die Lokalisation der Rezeptoren mit Hilfe von Ionophorese- Experimenten untersucht. Sie kamen ebenfalls zu dem Schluß, daß die äußere Kappe der Nervenzellen relativ insensitiv für Transmitter ist. Das ist in guter Übereinstimmung mit den Befunden, die del Castillio und Katz (1965) und Miledi(196o)(bei Vertebraten) gemacht haben. Danach beschränkt sich die Transmittersensibilität auf das Gebiet, das mit Transmittern in Berührung kommt. Nur scheinen in Mollusken, die Transmitter-Moleküle etwas mehr Raum für Diffusion zu haben und nicht so schnell inaktiviert zu werden, so daß der Ort der Synapse nicht so genau definiert ist, obwohl es wahrscheinlich einen Punkt höchsten Transmittersensitivität gibt.

Das Membranpotential läßt sich in der Regel nicht aus den Konzentrationen und Permeabilitäten der einzelnen Ionen ableiten. Carpenter (197o) hat gezeigt, daß die Na-Pumpe einen sehr wesentlichen Beitrag zum Membranpotential in Aplysia liefert. Auch K^+- und Cl^--Ionen werden, zumindest in einigen Zellen, aktiv transportiert (Kerkut und Walker, 1962; Russell und Brown,

1972). Die synaptischen Gleichgewichtspotentiale hängen also auch vom Metabolismus der Zelle ab. Auch das Membranpotential kann variieren je nach Temperatur und Aktivität der elektrogenen Pumpen.

6. Voltage-Clamp-Eigenschaften

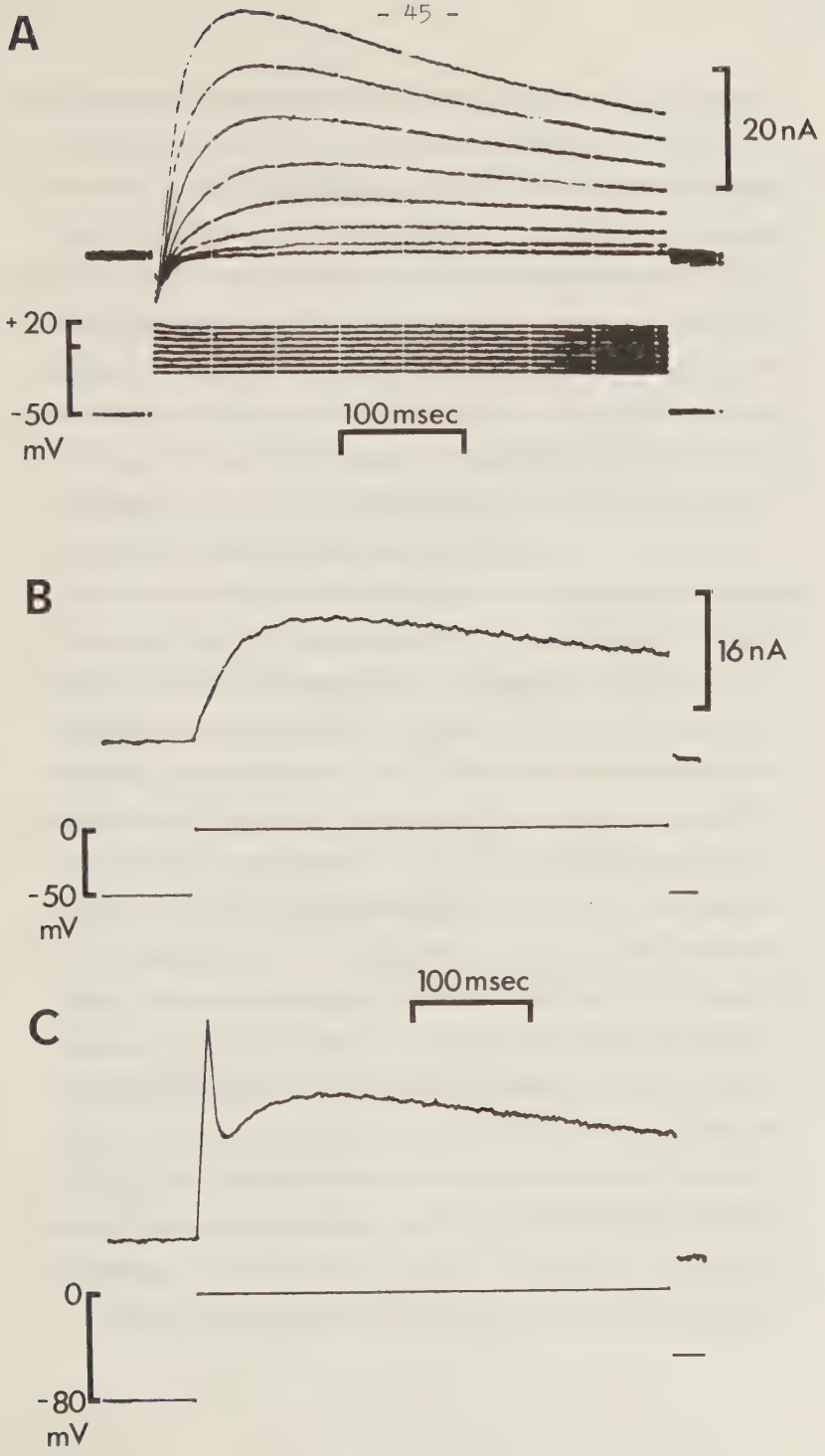
A. Der Einwärtsstrom und der langsame Auswärtsstrom

Der folgende Abschnitt liefert eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Voltage-Clamp-Eigenschaften der Riesenneurone des Visceralganglions. Eine detaillierte Beschreibung der Zeit- und Spannungsabhängigkeit der Voltage-Clamp-Ströme in diesen Zellen ist bei Neher (1970,1971) und Neher und Lux (1972) zu finden.

Mit der Patch-Clamp-Technik können - wie schon erklärt wurde (II, 4B) - die über einen umschriebenen Membranareal abfließenden Ströme, und damit die Permeabilitätsänderung in diesem Membranstück, mit sehr guter Auflösung gemessen werden. Für die hier beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Zellen mit einem

---

Abb. 10. A. Serie von Clamp-Strömen bei verschieden großen Depolarisationsschritten; Einwärtsstrom nach unten, Auswärtsstrom nach oben. B. Voltage-Clamp-Schritt von - 50 mV auf 0. C. Voltage-Clamp-Schritt von - 80 mV auf 0.


A
20 nA
+20
-50
mV
100 msec
B
16 nA
0
-50
mV
100 msec
C
0
-80
mV

Ruhepotential von mehr als -5o mV verwandt. Außerdem wurden nur die Resultate ausgewertet, bei denen die Leckleitfähigkeit, d.h. die Ruheleitfähigkeit des Membranareals unter der Pipette, sehr klein war (kleiner als $1o^{-1}$ Ω^{-1}). Stabile Messungen über längere Zeit sind nur möglich bei Zellen, bei denen die zeit- und spannungsunabhängigen Leckströme sehr klein sind im Vergleich zu den nach einem depolarisierenden Spannungsschritt auftretenden zeit- und spannungsabhängigen Voltage Clamp-Strömen.

In Abb. 1oA ist eine Serie von Clamp-Strömen, die in der Pipette gemessen wurden, übereinander projiziert. Ausgehend von einem Haltepotential von -5o mV wurden der Zelle depolarisierende Spannungsschritte auf -2o,-15, -1o....+15 mV aufgeprägt. Bei kleineren Depolarisationsschritten waren keine Ströme zu sehen. Bei einer Depolarisation auf -2o mV tritt ein schnell anschaltender Einwärtsstrom auf, der auf einer Permeabilitätsänderung der Membran für Na^+- und Ca^{++}-Ionen beruht. Dieser Einwärtsstrom inaktiviert sehr schnell; ihm folgt bei Depolarisation auf -15 mV ein langsam anschaltender Auswärtsstrom, der bei stärkeren Depolarisationen immer größer wird. Dieser verzögerte Auswärtsstrom inaktiviert ebenfalls sehr langsam; er wird von K^+-Ionen getragen.

Wie seit langem aus Untersuchungen am Tintenfischaxon bekannt ist, bewirkt der Na^+-Einwärtsstrom den Aufstrich des Aktionspotentials, während der langsame Auswärtsstrom während der Repolarisationsphase fließt.

B. Der schnelle K^+-Strom

In Abb. 1oB ist eine solche Stromspur herausgegriffen, und zwar der Strom, der bei einer Depolarisation von -5o mV auf O fließt. Wenn man nun von einem negativeren Membranpotential ausgeht und der Zelle einen Spannungssprung von - 8o mV auf O aufprägt, sieht die Stromkurve völlig anders aus (Abb. 1oC). Es ist deutlich zu erkennen, daß zu der langsamen Auswärtsstromkomponente eine zweite hinzugekommen ist, die wesentlich schneller an- und abschaltet.

Wenn man die beiden Kurven vergleicht, hat man den Eindruck, daß es sich in Abb. 1oC nicht nur um eine Modifikation der Kinetik des langsamen Auswärtsstromes handelt, sondern um eine zusätzliche Stromkomponente. Das ist in der Tat der Fall. Der schnelle Auswärtsstrom wird zwar ebenfalls von K^+-Ionen getragen, aber seine Spannungsabhängigkeit und seine Kinetik sind deutlich verschieden von der des langsamen K^+-Stromes (s. Neher, 1971). Diese schnelle Auswärtsstromkomponente konnte bisher nur in Nervenzellen von Mollusken nachgewiesen werden(Neher und Lux, 1969,1972; Neher 1971; Connor und Stevens, 1972; Faber und Klee, 1972). Ihre Eigenschaften wurden von Neher und Lux untersucht. Sie sollen im folgenden, zum besseren Verständnis der Resultate dieser Arbeit, kurz zusammengefaßt werden.

Die schnelle K^+-Stromkomponente hat einige Be-

sonderheiten, die sie von den in allen erregbaren Membranen vorhandenen Stromkomponenten, dem Na^+-Einwärtsstrom und dem langsamen K^+-Auswärtsstrom, unterscheiden.

Die auffälligste Eigenschaft dieses zusätzlichen K^+-Stromes ist die, daß er auch unterhalb der Schwelle des Aktionspotentials aktiviert wird. Die Schwelle des Aktionspotentials liegt im Zellsoma von Helix pomatia bei etwa -25 mV, während die Schwelle des schnellen K^+-Stromes bei etwa -5o mV liegt. Durch Depolarisationen in dem Bereich zwischen -5o und -25 mV werden also weder der schnelle Einwärtsstrom noch der langsame Auswärtsstrom, sondern ausschließlich der schnelle K^+-Auswärtsstrom aktiviert. Dieser Befund legt nahe, daß der schnelle K^+-Strom nichts mit der Entstehung des Aktionspotentials zu tun hat. Das ist schon deshalb erstaunlich, weil die Genese des Aktionspotentials die einzige Funktion war, die man bisher zeit- und spannungsabhängigen Membranströmen vom Hodkin-Huxley-Typ zuschrieb.

Der zweite bemerkenswerte Befund ist der, daß die schnelle K^+-Stromkomponente nicht aktivierbar ist, wenn die Zelle auf einem Membranpotential von weniger (positiver) als -5o mV gehalten wird. Der schnelle K^+-Strom kann nur aktiviert werden, wenn eine Depolarisation von einem Membranpotential ausgeht, das negativer ist als -5o mV. Er wird dann aber innerhalb von 4oo - 5oo msec wieder völlig inaktiviert. Zur Ruheleitfähigkeit der Membran trägt der schnelle K^+-Strom also weder bei einem

Membranpotential über -5o mV noch unter -5o mV etwas bei.

Die dritte interessante Eigenschaft ist die schnelle Kinetik dieses Stromes. Er schaltet fast genauso schnell an und ab wie der Einwärtsstrom.

Da man den schnellen K^+-Strom im Bereich zwischen -5o und -25 mV getrennt von den anderen Stromkomponenten darstellen kann, ist es relativ leicht, seine Aktivations- und Inaktivationskinetik zu bestimmen. In Abb. 11 ist an einem Beispiel zu sehen, wie die Spannungs-

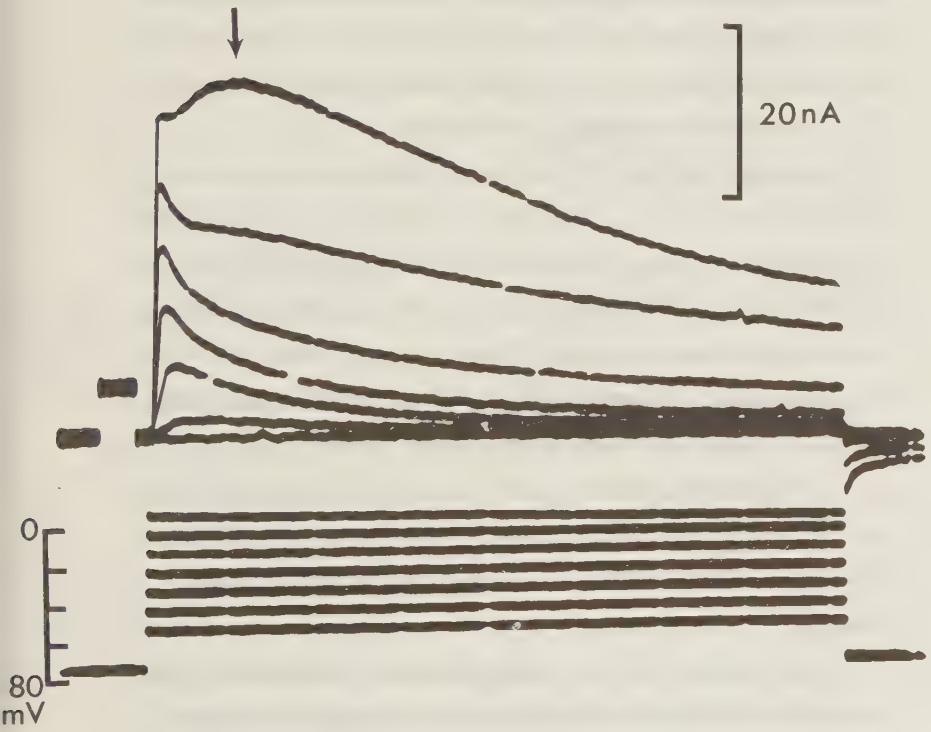


Abb. 11. Der schnelle und der langsame K^+-Strom.

abhängigkeit des schnellen K^+-Stromes bestimmt wurde. Die Zelle hatte ein Ruhepotential von -73 mV. Vom Ruhepotential ausgehend wurden der Zelle, in Abständen von 1o sec depolarisierende Spannungsschritte (Testpulse) auf -53, -43, -33, -23, -13,-3 und +7 mV aufgeprägt. Bei Depolarisation auf -53 mV floß kein Strom (unterste Spur). Bei stärkeren Depolarisationen wurde die schnelle K^+-Stromkomponente aktiviert. Bei Depolarisationen auf -13, -3 und +7 mV (oberste Spuren) wurde auch der langsame K^+-Strom aktiviert (Pfeil), der bei dieser Zelle zeitlich nicht so klar vom schnellen K^+-Strom abgesetzt war wie z.B. in Abb. 1o. In den beiden obersten Spuren kann man jedoch deutlich die beiden Stromkomponenten unterscheiden.

In dem in Abb. 12A dargestellten Experiment mit der gleichen Zelle wurde nun der depolarisierende Spannungsschritt (Testpuls) auf ein Niveau von -28 mV eingestellt, so daß ausschließlich der schnelle K^+-Strom aktiviert wurde (man beachte die andere Stromeichung). Nun wurde das Ausgangsniveau (d.h. das Membranpotential vor dem Testpuls) auf verschiedene Werte zwischen -73 und -53 mV eingestellt, und zwar durch depolarisierende Pulse (Vorpulse) von 2 sec Dauer. Der Potentialverlauf ist in Abb. 12A noch einmal schematisch dargestellt.

Man sieht, daß die Amplitude des schnellen K^+-Stromes sehr stark von der Größe des Vorpulses abhängig ist. Wenn man die Amplitude des schnellen K^+Stromes gegen

das absolute Membranpotential während des Vorpulses aufträgt, erhält man eine S-förmige Kurve, die sog. Inaktivationskurve (Abb. 13A). Bei -53 mV (oder positiveren Membranpotential-Werten) ist der schnelle K^+-Strom vollständig inaktiviert. Zwischen -55 mV und -65 mV ist die Inaktivationskurve sehr steil; bei -75 mV ist ein Plateau erreicht, d.h. der Strom ist vollständig im aktivierten Zustand.

In Abb. 12B wird nun die Abhöngigkeit des schnellen K^+-Sttomes vom Testpulsniveau gezeigt. Der Potentialverlauf ist wieder in Abb. 12B illustriert. Ausgehend vom Ruhepptential von -73 mV, wo der schnelle Kaliumstrom vollständig aktiviert ist, wurden der Membran depolarisierende Spannungsschritte (Testpulse) auf Potentialniveaus zwischen -53 und -28 mV aufgeprägt.

Die Abhängigkeit der Amplitude des Stromes vom Testpulspotential ist in Abb. 13B aufgetragen. Die Schwelle des schnellen Kaliumstromes liegt bei -5o mV, und seine Amplitude nimmt bei Vergrößerungen der Depolarisationsschritte sehr schnell zu.

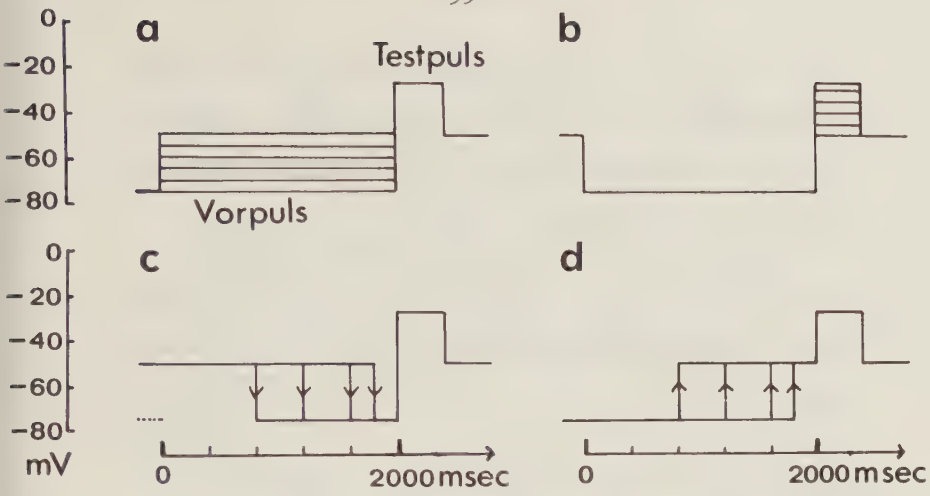
Die Einstellung des Aktivationszustandes des schnellen K^+-Stromes auf ein bestimmtes Potential, wie in Abb. 13A, erfolgt nicht sprunghaft, sondern mit einem langsamen Zeitverlauf. Diesen Zeitverlauf bestimmt man mit Experimenten, in denen das Potentialniveau des konditionierenden Vorpulses konstant gehalten wird und die Dauer des Vorpulses variiert wird. In dem in Abb.

12C abgebildeten Experiment wurde die Zelle auf einem Potential von -53 mV gehalten, wo der schnelle Kaliumstrom vollständig inaktiviert ist. Ausgehend von diesem Haltepotential wurden der Zelle hyperpolarisierende Vorpulse auf -73 mV aufgeprägt, um die Inaktivation aufzuheben. Die Dauer der Vorpulse wurde zwischen 0 und 1ooo msec variiert (siehe Schema des Potentialverlaufs in Abb. 12C).

In Abb. 13C ist die Amplitude des schnellen K^+-Stromes als Funktion der Dauer des Vorpulses aufgetragen. Man sieht, daß die Aufhebung der Inaktivation einen exponentiellen Zeitverlauf hat. Die Zeitkonstante der Inaktivation, τ_b (das ist in diesem Fall die Zeit, in der die Inaktivation von ihrem maximalen Wert 1 auf den Wert 1/e abgefallen ist), betrug 31o msec.

Der Zeitverlauf, mit dem sich der Aktivationszutand aufs ein neues Potential einstellt, ist immer exponentiell. Die jeweilige Zeitkonstante hängt jedoch ebenfalls vom Vorpulspotential ab (siehe Neher, 1971). Das kann man auch sehen, wenn man das umgekehrte Experiment macht, das in Abb. 12D dargestellt ist. Hier wurde vom voll aktivierten Zustand des schnellen K^+-Stromes ausgegangen, nämlich von einem Haltepotential von -73 mV. Vor dem Standardtestpuls auf -28 mV wurden der Zelle depolarisierende Vorpulse aufgeprägt, deren Dauer variiert wurde (siehe Abb. 12D).

Der während des Testpulses fließende Strom war in diesem Fall umso kleiner, je länger der Vorpuls dauerte.



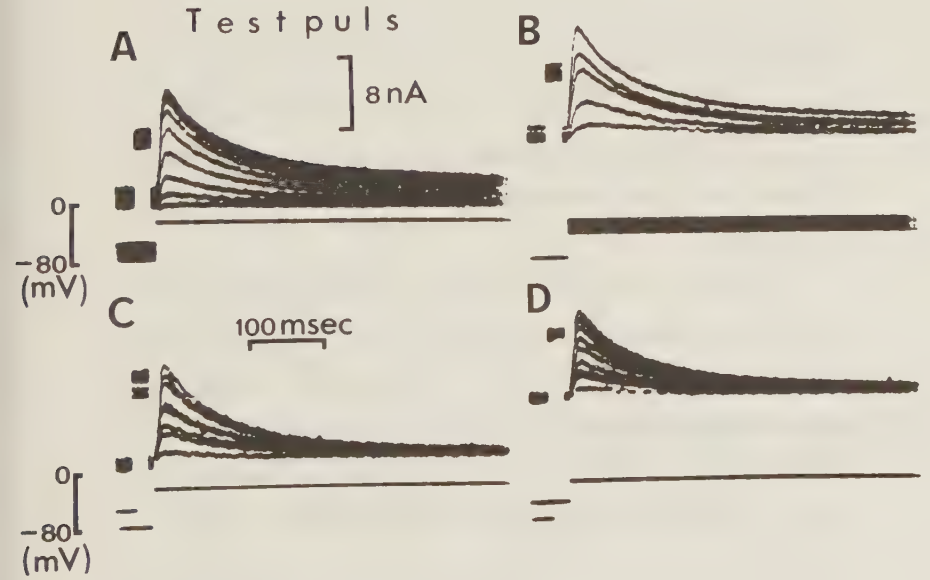


Abb. 12. Bestimmung der Charakteristiken des schnellen K^+-Stroms; alle Registrierungen von der gleichen Zelle wie Abb. 11. Die Spannungsverläufe von A,B,C,D (jeweils untere Spuren) sind in a,b,c,d noch einmal schematisch dargestellt.(Am Anfang der Stromspur ist jeweils ein Kontroll-Puls zur Bestimmung des Abdicht-Widerstandes der Pipette).

In Abb. 13D sieht man, daß auch hier die Inaktivation des schnellen K^+-Stromes einen exponentiellen Zeitverlauf hat. Die Zeitkonstante τ_b für das Einstellpotential von -53 mV betrug 22o msec.

Mit Hilfe der durch diese Experimente gewonnenen Parameter läßt sich die Größe des schnellen K^+-Stromes unter allen Bedingungen berechnen. Wie E. Neher (1971) gezeigt hat, säßt sich der schnelle K^+-Strom mit einem ähnlichen Formalismus beschreiben, wie er von Hodgkein und Huxley für den Na^+-Einwärtsstrom am Tintenfischaxon benutzt wurde, und zwar mit der Gleichung

$$I_A = g_A \, a^3 b \, (V - V_A)$$

wobei I_A die Stromdichte des Auswärtsstromes ist, g_A die maximale Größe der K^+-Leitfähigkeit der Membran, a und b sind die Aktivations- bzw. Inaktivationsvariablen, die die Wahrscheinlichkeit anzeigen, mit der ein K^+-Kanal in einem offenen (a)oder geschlossenen (b) Zustand ist.

E. Neher konnte nun zeigen, daß sich der Auswärtsstrom unter allen Bedingungen als eine rein additive Superposition eines schnellen K^+-Stromes mit obiger Kinetik und des normalerweise vorhandenen langsamen Auswärtsstromes darstellen läßt. Das gilt allerdings nicht, wenn sehr lange Clamppulse verwandt werden (s. Neher und Lux, 197o).

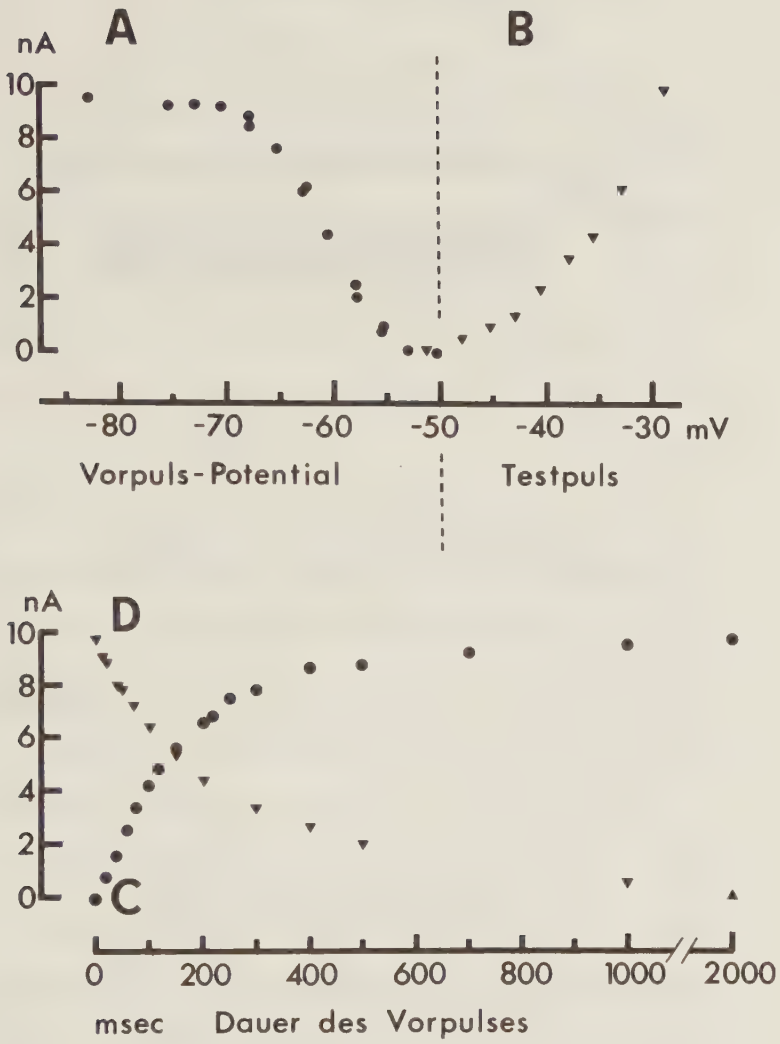


Abb. 13. Die Kennlinien der Zelle von Abb. 12. Die Amplitude des schnellen K^+-Stromes ist als Funktion des konditionierenden Membranpotentials während des Vorpulses (A), der (absoluten) Höhe des Testpulses (B), und als Funktion der Dauer eines hyperpolarisierenden (C) bzw. depolarisierenden (D) Testpulses aufgetragen.

C. Zellen ohne schnellen Kaliumstrom

In allen Zellen des Bündels unmittelbar neben dem Eingang des Analnerven ins Visceralganlion, das für die vorliegende Arbeit benutzt wurde, ist die schnelle K^+-Stromkomponente zu finden. Ihre relative Größe im Vergleich zum langsamen K^+-Auswärtsstrom variiert etwas von Zelle zu Zelle. In den ganz großen Zellen, die über 2oo u Durchmesser haben, ist sie oft etwas kleiner als in den Zellen, die einen Durchmesser von 1oo bis 15o µ haben.

Unmittelbar dorso-caudal von den hier beschriebenen Zellen fand ich eine Gruppe von Neuronen, bei denen die schnelle K^+-Stromkomponente völlig fehlt. Ein Beispiel einer solchen Zelle ist in Abb. 14 zu sehen. In Abb. 14A sind, ausgehend von einem Ruhepotential von -48 mV der Zelle depolarisierende Spannungsschritte auf -18, -8, +2, +12, +22, und +32 aufgeprägt worden, und man sieht die übliche Folge von schnellem Einwärtsstrom und langsamem Auswärtsstrom. Bei einem Testpuls auf -18 mV ist kein nennenswerter Auswärtsstrom zu sehen (Abb. 14A, unterste Pfeilspur). Wenn dem Testpuls ein hyperpolarisierender Vorpuls von 2 sec. Dauer auf -78 mV vorausgeht, ist nicht die geringste Änderung in der Stromspur zu sehen (Abb. 14B). Ebenso ist bei großen Testpulsen, auf -2 mV, keine zusätzliche Stromkomponente zu sehen, wenn man dem Testpuls einen hyperpolarisierenden Vorpuls vorausschickt, wie aus den bei-

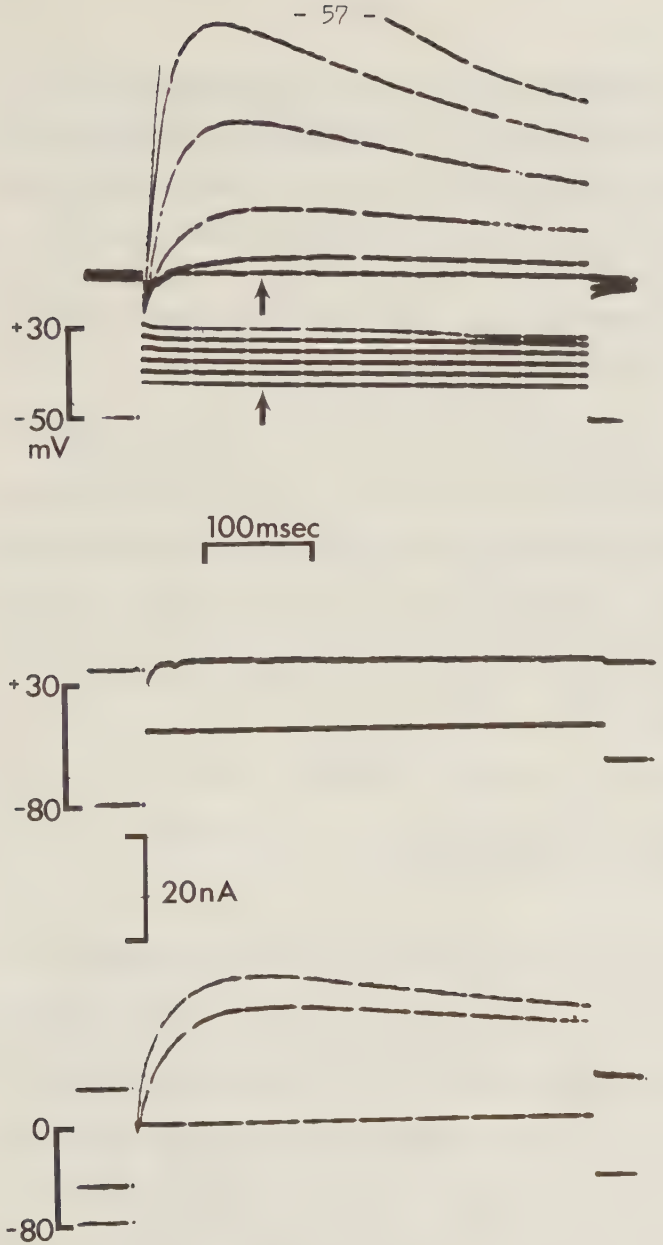


Abb. 14. Zelle ohne schnellen K^+-Strom.

den superponierten Spuren von Abb. 14C zu sehen ist. Der langsame K^+-Strom ist lediglich etwas vergrößert. Das ist deshalb der Fall, weil der Aktivationszustand des langsamen K^+-Stromes ebenfalls von der Höhe des initialen Membranpotentials abhängt, wenn auch bei weitem nicht so stark, wie das bei dem schnellen K^+-Strom der Fall ist.

Ich habe nur wenige der Zellen, in denen die schnelle K^+-Stromkomponente fehlt, untersucht. Bemerkanswerterweise fanden sich bei ihnen regelmäßig spontane IPSPs. Spontane oder durch Reize auslösbare IPSPs wurden nie bei der Gruppe von Zellen gefunden, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Auf diese Beobachtungen wird in der Diskussion noch genauer eingegangen.

7. Injektion von Strompulsen

In diesem Abschnitt soll kurz dargelegt werden, wie sich die Zellen, die eine schnelle K^+-Stromkomponente haben, im ungeklemmten Zustand verhalten. Auch unter Current-Clamp-Bedingungen, d.h. wenn das Membranpotential nicht geklemmt, sondern nur durch kontrollierte Strominjektion variiert wird, macht sich der Einfluß des schnellen K^+-Stromes bemerkbar. Unterhalb der Schwelle des Aktionspotentials verhält sich die Zellmembran normalerweise rein passiv - wie ein Widerstand,

der mit einem Kondensator parallel geschaltet ist. Bei Applikation von konstanten, hyperpolarisierenden (Einwärts-)Strompulsen stellt sich das Membranpotential auf einen neuen Wert ein, der proportional der injizierten Stromstärke ist. (Anomale Gleichrichtung, d.h. eine Abnahme des Membranwiderstandes mit zunehmender Hyperpolarisation, ist in den hier untersuchten Zellen nicht vorhanden.

Der Zeitverlauf, mit dem sich das Potential einstellt, ist annähernd exponentiell. Er hängt erstens von der Membranzeitkonstante ($\tau_m = R_m C_m$), zweitens davon, welcher Anteil des Stromes ins Axon abfließt, also vom Faktor ς (s. S.36). Wenn man in den hier untersuchten Zellen, von einem Membranpotential von -5o mV (oder positiver) ausgehend gleich große depolarisierende und hyperpolarisierende Strompulse appliziert, erhält man völlig symmetrische Potentialauslenkungen, vorausgesetzt, daß durch die Depolarisation kein Aktionspotential ausgelöst wird.

Wenn man das gleiche Experiment bei einem Haltepotential von -6o oder -7o mV macht, verhält sich die Zelle bei Injektion kleiner Strompulse ebenfalls rein passiv (Abb. 15A, mittlere Spuren). Bei größeren Strompulsen erhält man jedoch bei Hyperpolarisation und Depolarisation völlig asymmetrische Potentialverläufe. Die hyperpolarisierende Spannungsauslenkung verläuft wie zuvor, während bei der Depolarisation ein eigenartiger "notch" zu sehen ist, eine kurzzeitige Umkehr der Po-

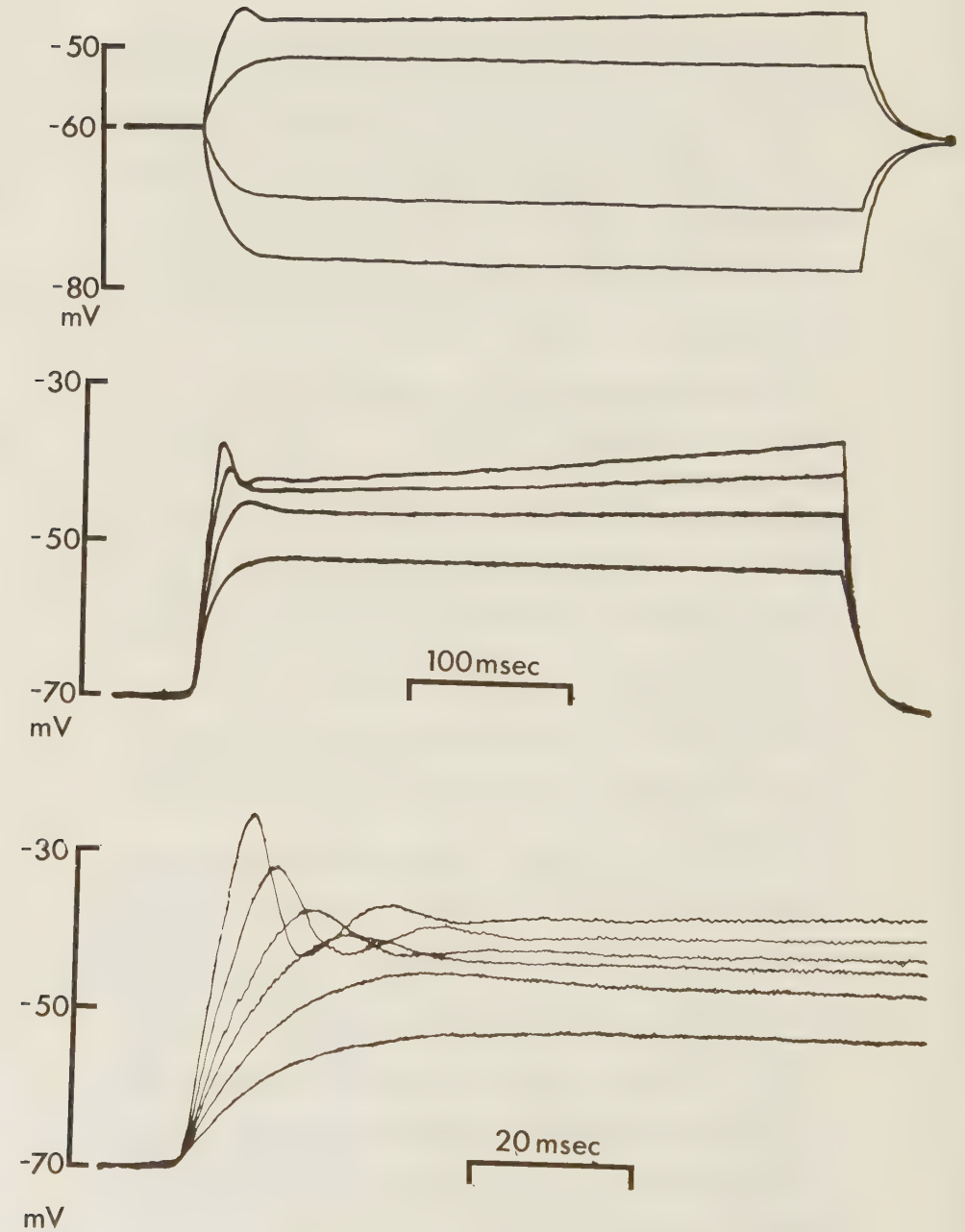


Abb. 15. Injektion von Strompulsen verschiedener Stromstärke.

tentialverlaufs (Abb. 15A). Nach dem notch setzt sich die Depolarisation deutlich verlangsamt fort. Falls nicht die Aktionspotential-Schwelle überschritten wird, stellt sich schließlich ein steady state- Potential ein, das genauso weit vom Ausgangspotential entfernt ist, wie das steady state Potential bei gleichgroßen hyperpolarisierenden Pulsen. Der Depolarisation wirkt offensichtlich zeitweise eine Kraft entgegen. Wenn man den Potentialverlauf genauer analysiert, wird sofort klar, daß es die elektromotorische Kraft (EMK) des oben beschriebenen schnellen K^+-Stromes ist, die der Depolarisation entgegenwirkt. Die Verzögerung der Depolarisation entspricht nämlich in Schwelle, Richtung und Zeitverlauf genau dem schnellen K^+-Strom. Analog dem Verhalten des schnellen K^+-Stromes im Voltage Clamp sind die notches umso ausgeprägter, je negativer das Membranpotential vor dem Strompuls ist und je stärker der Strompuls ist. Das ist in Abb 15B demonstriert, wo von einem Membranpotential von -7o mV ausgehend, verschieden starke depolarisierende Strompulse in die Zelle injiziert wurden. In Abb. 15C ist das gleiche Experiment mit schnellerer Zeitschreibung gezeigt. Die Erklärung für die kleinen Schwingungen, die nach den notches zu sehen sind, ist noch unklar. Diese Schwingungen wurden nur in einigen Zellen, bei denen der schnelle K^+-Strom besonders stark ausgeprägt war, beobachtet. Sie hängen wahrscheinlich mit einer Verzögerung der Ausbreitung der Depolarisation ins Axon

zusammen.

Wenn die Zelle ein Membranpotential von mehr als -6o mV hat, sind Aktionspotentiale auch mit sehr starken depolarisierenden Strompulsen nur nach einer Verzögerung von einigen 1oo msec auszulösen.

Völlig anders verhalten sich die Zellen, bei denen der schnelle K^+-Strom fehlt. Abb. 16 zeigt, daß bei diesen Zellen die Auslösung der Aktionspotentiale durch depolarisierende Strompulse nicht die geringste Verzögerung erfährt, und daß die Depolarisation bis zum Erreichen der Schwelle des Na^+-Stromes anscheinend rein passiv ist.

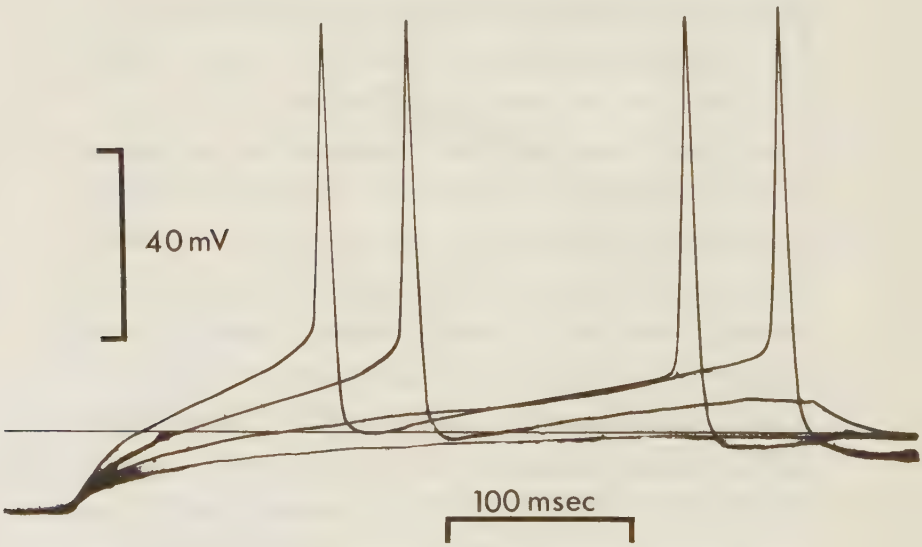


Abb. 16. Das Verhalten einer Zelle ohne schnellen K^+-Strom bei Injektion von Strompulsen verschiedener Stromstärke; vier übereinanderprojizierte Spuren.

V. ERGEBNISSE

1. Der schnelle K^+-Strom im Axon

A. Theorie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung des schnellen K^+-Stromes auf erregende synaptische Potentiale zu untersuchen. Bisher wurde der schnelle K^+-Strom nur im Zellsoma gemessen. Da die EPSPs aber im Axon, in einiger Entfernung vom Zellsoma, entstehen, ist die Frage, ob der schnelle K^+- Strom auch im Axon vorhanden ist oder nicht, von großer Bedeutung für seine mögliche Wirkung auf EPSPs.

Die Wirkungen, die ein schneller K^+-Strom in der Membran des Axons auf EPSPs haben könnte, sind sehr komplex. Erstens würde die durch Depolarisation angeschaltete Erhöhung der K^+-Leitfähigkeit die erregenden synaptischen Ströme durch ihre shunt-Wirkung kurzschließen, d.h. die Depolarisation am Ort der Synapse und ihre zentrifugale und zentripetale Ausbreitung erschweren. Im Zellsoma würde man also EPSPs mit kleinerer Amplitude, und, wegen der Erhöhung des elektrotonischen Abstandes ($\lambda = D/2 \sqrt{R_m/R_i}$) eine Verlängerung

der Anstiegszeit und eine sehr starke Verlängerung der Abfallzeitkonstanten der EPSPs erwarten. Zweitens würde der hypopolarisierende "drive" des K^+-Stromes der Depolarisation direkt entgegenwirken. Die Größe dieser Wirkung würde vom Verhältnis der K^+-Permeabilitätserhöhung zur Ruhepermeabilität der Membran abhängen.

Diese Wirkungen können aber experimentell nur sehr schwer von den Wirkungen unterschieden werden, die ein nur im Soma vorhandener schneller K^+-Strom auf die EPSPs haben würde. Auch dann würde man nämlich eine Verkleinerung und Abflachung der EPSPs erwarten, wenn auch in geringerem Ausmaß.

Da das Axon für direkte Messungen nicht zugänglich ist, wurde eine indirekte Methode benutzt, um über das Vorhandensein des schnellen K^+-Stromes im Axon Aufschluß zu gewinnen. Ich habe den gleichen Vorgang, der sich bei der Übertragung eines EPSPs abspielt, nämlich die Ausbreitung einer depolarisierenden Welle durch das Axon, nicht zentripetal, sondern zentrifugal (vom Soma ins Axon) ablaufen lassen. Dazu erwiesen sich die Axonspikes, die sog. Axon"artefakte" als sehr nützlich, obwohl ursprünglich viel Mühe darauf verwendet wurde, sie möglichst klein zu halten (siehe S. 22). Wie schon im Kapitel 4 dargelegt wurde, breitet sich ein depolarisierender Voltage Clamp-Schritt im Soma passiv ins Axon aus und löst schließlich an der Stelle, wo die Schwelle am niedrigsten ist, in der Spike-Trigger-Zone, ein Aktionspotential aus. Diese Spike-Trigger-Zone liegt nach

Tauc (1962) bei Aplysia ganz in der Nähe der Synapsen, was ich auch bei Helix annehmen möchte.

Wenn diesem depolarisierenden Spannungssprung im Soma ein hyperpolarisierender Vorpuls vorausgeht, und infolgedessen auch der im Axon vorhandene schnelle K^+-Strom in einen aktivierten Zustand versetzt wird, müßte dadurch Strom auf Grund genau der gleichen Mechanismen, mit denen die Ausbreitung der EpSPs ins Soma gehemmt wird, auch die Ausbreitung des depolarisierenden Pulses vom Zellsoma zur Spike-Trigger-Zone gehemmt werden, nämlich durch den shunt (Leitwerterhöhung) und den hyperpolarisierenden "drive". Somit müßte sich nach einem hyperpolarisierenden Vorpuls die Latenz der Axonspikes verlängern. Es zeigte sich nun, daß verschiedenen experimentellen Bedingungen eine sehr enge Korrelation zwischen der Amplitude des schnellen K^+-Stromes und der Latenz der Axonspikes besteht. Dies konnte an den folgenden beiden Experimenten gezeigt werden, die ich 1.Axonspike-Experiment und 2. Axonspike-Experiment nennen möchte.

Das 1. Axonspike-Experiment

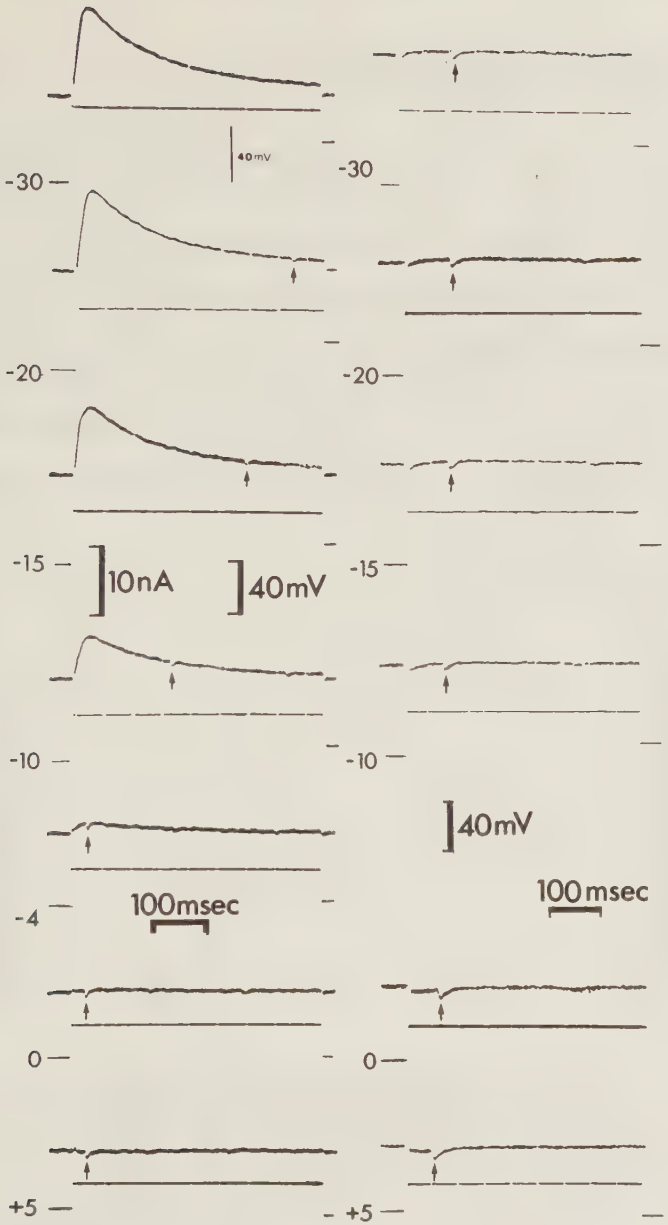
Wie bei dem Experiment, mit dem man die Inaktivations-Kurve (Abb. 12A) des schnellen K^+-Stromes bestimmt, wurden der Zelle (ausgehend vom Ruhepotential -55 mV) verschiedene konditionierende Potentiale (Vorpulse) aufgeprägt, denen ein konstanter Testpuls folgte. Die re-

sultierenden Stromkurven wurden auf Band aufgezeichnet und später wurden sowohl die Amplitude des Stromes als auch die zugehörige Latenz des ersten Axonspikes ausgemessen. Dazu wurden Zellen ausgewählt, bei denen die Axonspike-Zacke in der Strommessung gut sichtbar war, aber doch möglichst kurz und so klein, daß die Genauigkeit der Strommessung nicht beeinträchtigt wurde. Es zeigte sich, daß ohne Vorpuls die Latenz der Axonspikes sehr kurz war (ca. 1o msec), und daß bei größeren hyperpolarisierenden Vorpulsen sich die Latenz der Axonspikes in fast genau proportionaler Weise mit der Zunahme des schnellen K^+-Stromes verlängerte (s. Abb. 17, linke Spalte).

Wenn man die Axonspike Latenz einerseits und die Größe des schnellen K^+-Stromes andererseits in Abhängigkeit vom Potentialniveau des Vorpulses aufträgt, ergeben sich Kurven genau der gleichen Form (Abb. 18). Dieses Experiment wurde oft wiederholt, mit immer dem gleichen Resultat.

Völlig anders verhalten sich die Zellen, in denen kein schneller K^+-Strom vorhanden ist. Wie in der rechten Spalte von Abb. 17 zu sehen ist, wird in diesen Zellen die Latenz der Axonspikes auch mit sehr größen Vorpulsen fast überhaupt nicht verändert.

Abb. 17. Das Verhalten der Latenz der Axon-Spikes (Pfeile) und der Amplitude des schnellen K^+-Stromes bei Variation der Höhe des Vorpulses. Linke Spalte: Zelle mit schnellem K^+-Strom.



Rechte Spalte: Zelle ohne schnellen K^+-Strom. Das Haltepotential war - 50 mV. Die Zahlen geben die Amplitude des Vorpulses (in mV) an.

C. Das 2. Axonspike-Experiment

Wie schon auf S. [illegible] erklärt wurde, kann man den zeitlichen Verlauf der Inaktivation dadurch bestimmen, daß man die Dauer eines Vorpulses variiert (siehe Abb. 12C, 13C). Der Aktivationszustand des schnellen K^+-Stromes nähert sich exponentiell (mit einer Zeitkonstante τ_b) dem Wert, der dem absoluten Potential des Vorpulses entspricht.

Wenn man nun in diesem τ_b-Experiment noch zusätzlich die Latenzen der Axonspikes mißt, stellt man fest,

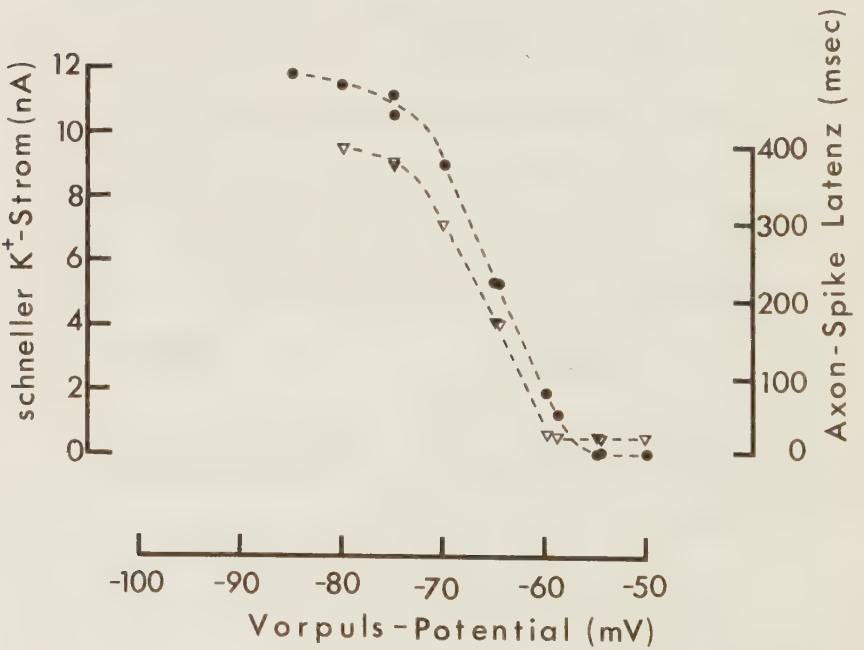


Abb. 18. Die Amplitude des schnellen K^+-Stromes (Punkte) und die zugehörige Latenz des ersten Axon-Spikes (Dreiecke) als Funktion des Membranpotentials während eines 2 sec langen Vorpulses; gleiche Zelle wie Abb. 17.

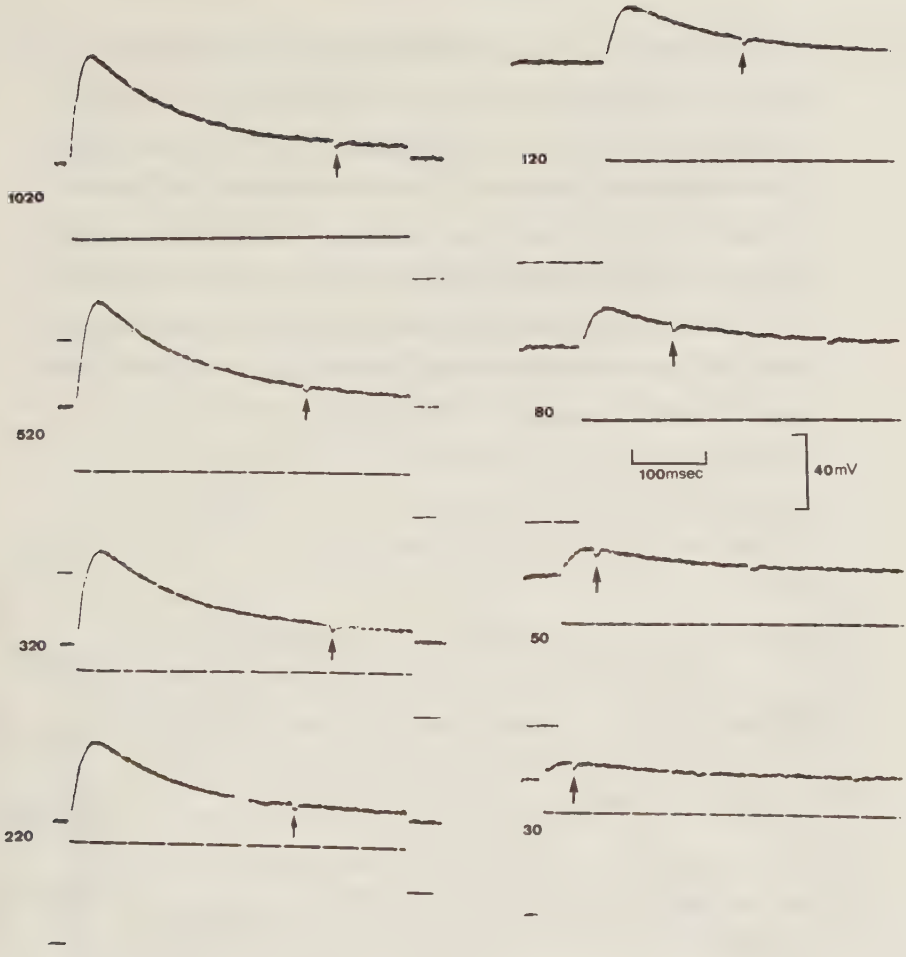


Abb. 19. Die Amplitude des schnellen K^+-Stromes und die Latenz der Axon-Spikes bei Variation der Dauer eines konditionierenden Vorpulses von - 50 mV auf - 75 mV; gleiche Zelle wie Abb. 17 und 18. Die Zahlen geben die Dauer des hyperpolarisierenden Vorpulses in msec an.

daß sie, genau wie die Amplitude des schnellen K^+-Stromes, mit der Dauer des Vorpulses zunehmen (Abb. 19). In Abb. 2o ist nun die Abhängigkeit des Maximums (peak) des schnellen K^+-Stromes • ,und der Latenz der Axonspikes ▽, von der Dauer des Vorpulses aufgetragen. Man sieht, daß beide Größen auf genau die gleiche Weise von der Dauer des Vorpulses abhängen, und daß sie sich fast mit dem gleichen Zeitverlauf ihrem steady state-(Gleichgewichts-)Wert nähern.

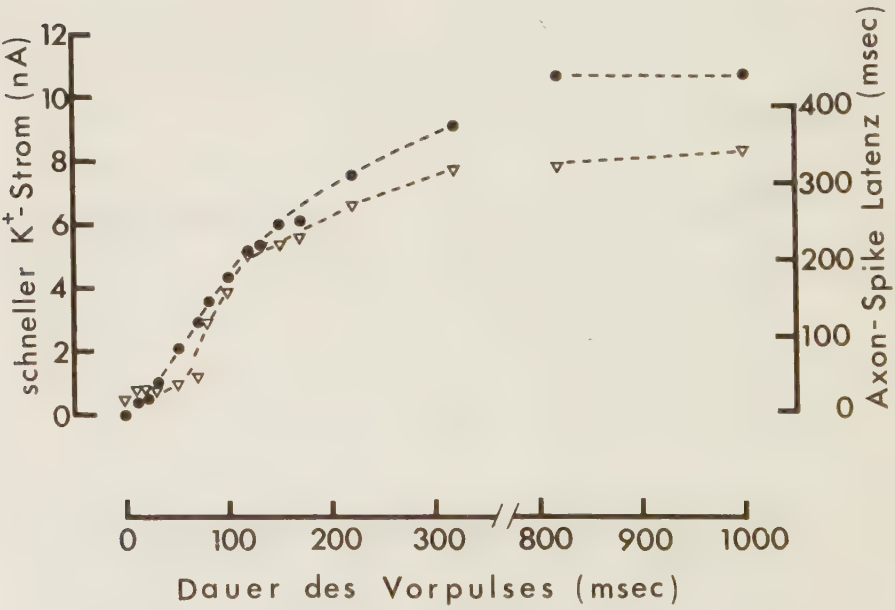


Abb. 20. Die Amplitude des schnellen K^+-Stromes (Punkte) und die zugehörige Latenz des ersten Axon-Spikes (Dreiecke) als Funktion der Dauer des konditionierenden Vorpulses; gleiche Zelle wie Abb. 17-19.

Wenn man die Axonspike-Experimente betrachtet, sieht es in der Tat so aus, als ob die Latenz der Axonspikes sehr eng mit der Größe des schnellen K^+-Stromes korrelliert ist. Der Schluß liegt nahe, daß durch den hyperpolarisierenden Vorpuls im Soma auch ein schneller K^+-Strom im Axon aktiviert wird, und daß dieser für die Verzögerung der Axonspikes verantwortlich ist. Der im Soma vorhandene schnelle K^+-Strom kann keinen Einfluß auf die Ausbreitung der Voltage-Clamp-Depolarisation ins Axon haben, da er vollständig von der Voltage-Clamp-Elektronik kompensiert wird (d.h. der Potentialverlauf im Soma ist völlig unabhängig von der Größe des schnellen K^+-Stromes).

Es bleibt aber noch die Möglichkeit, daß auch die passive Polarisation des Axons durch den Vorpuls bei der Latenzverschiebung der Axonspikes eine Rolle spielen könnte, denn offensichtlich hängt das Erreichen der Schwelle des Aktionspotentials auch von der absoluten Größe des Membranpotentials der Trigger-Zone zu Beginn des Testpulses ab. Die passive Polarisation des Axons hängt natürlich ebenfalls von Dauer und Höhe des Vorpulses ab. Man kann also die Verlängerung der Axonspike Latenz nur dann der Wirkung des schnellen K^+-Stromes zuschreiben, wenn man große Sorgfalt darauf verwendet, einen etwaigen Einfluß der passiven Polarisation des Axons auszuschließen bzw. in seiner Größe abzuschätzen.

Mit Hilfe der folgenden Überlegungen lassen sich die relative Größe der Wirkung der passiven Polarisation

des Axons einerseits und des schnellen K^+-Stromes andererseits abschätzen.

D. Der Beitrag der passiven Polarisation zur Latenzverschiebung der Axonspikes

Im 2. Axonspike-Experiment dürfte die Ausbreitung der Polarisation im Axon bei hyperpolarisierenden Vorpulsen spätestens nach 5o-1oo msec ihren steady state erreicht haben. Die Ausbreitung der Hyperpolarisation ins Axon ist nämlich dann abgeschlossen, wenn der Stromfluß ins Axon seinen steady state erreicht hat. Dieser Stromfluß ins Axon ist in Ableitungen des Gesamt-Zell-Stromes bei hyperpolarisierenden Voltage Clamp-Pulsen zu sehen. Nachdem die Kapazität der Membran nach einigen usec entladen ist, sieht man noch einen langsameren Strom-"Schwanz", der den annähernd exponentiellen Verlauf darstellt, mit dem sich der Strom auf den dem jeweiligen Potential entsprechenden Wert einstellt (Abb. 21; siehe auch Neher, 1971, Abb. 1B). Dieser Strom-Schwanz ist nach 5o msec auf weit weniger als 1/1o seines Anfangswertes gefallen, so daß man annehmen kann, daß sich die Potentiale im Axon nach 5o msec kaum noch verändern. Die Wirkung der passiven Polarisation des Axons müßte also schon nach 5o msec ihr Maximum erreicht haben.

Wie aus Abb. 2o zu ersehen ist, hat die Verschiebung der Axonspike Latenz nach 5o msec keineswegs ihr Maximum erreicht, sondern sie folgt dem viel langsameren Zeitverlauf der τ_b-Kurve. Es ist zu erkennen, daß die Verschiebung der Axonspike Latenz erst nach etwa 5o msec beginnt. Auch dieser Effekt läßt sich in Beziehung setzen mit der Änderung des Aktivationszustandes des schnellen K^+-Stromes im Axon. Wenn nämlich die Polarisation des Axons einige msec in Anspruch nimmt, muß sich natürlich auch die Aufhebung der Inaktivation des schnellen

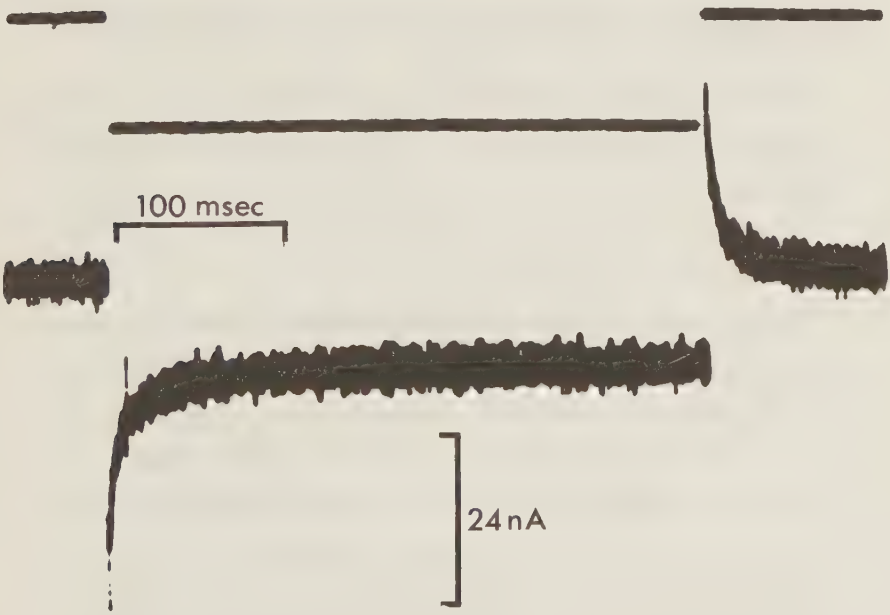


Abb. 21. Registrierung des Clamp-Stromes von der ganzen Zelle in der Erdleitung des Ringerbades bei einem hyperpolarisierenden Voltage-Clamp-Puls von - 50 auf - 80 mV.

K^+-Stromes im Axon etwas verzögern.

Völlig anders würde sich ein eventueller Beitrag der passiven Polarisation auf die Verschiebung der Latenz im 1. Axonspike-Experiment auswirken. Hier würde die Axonspike-Latenz in etwa proportional zur Höhe des Vorpulses verschoben werden, da auch die hyperpolarisierende Potentialauslenkung in der Spike-Trigger-Zone am Ende des Vorpulses der Höhe des Vorpulses proportional ist (steady state).

Diese Überlegungen zeigen, daß sich ein eventueller Einfluß der passiven Polarisation auf die Latenzverschiebung der Axonspikes in den beiden verschiedenen Experimenten auch sehr verschieden auswirken würde. In beiden Experimenten ist aber die Relation zwischen Axonspike-Latenzverschiebung und schnellem Kaliumstrom völlig gleich. Dies ist aus Abb. 22 zu ersehen, wo die Latenz der Ax onspikes als Funktion der Größe des schnellen K^+-Stromes aufgetragen ist und zwar sowohl vom 1. (Kreise) als auch vom 2. Axonspike-Experiment (Dreiecke). In beiden ist die Axonspike-Latenz in etwa proportional der Größe des schnellen K^+-Stromes. Dieser Befund macht es äußerst unwahrscheinlich, daß die passive Polarisation des Axons eine Rolle bei der Verzögerung der Axonspikes spielt. Das überzeugendste Argument dafür, daß ausschließlich der schnelle K^+-Strom im Axon für die Latenzverschiebung der Axonspikes verantwortlich ist, ist das völlige Fehlen der Latenzverschiebung in Zellen

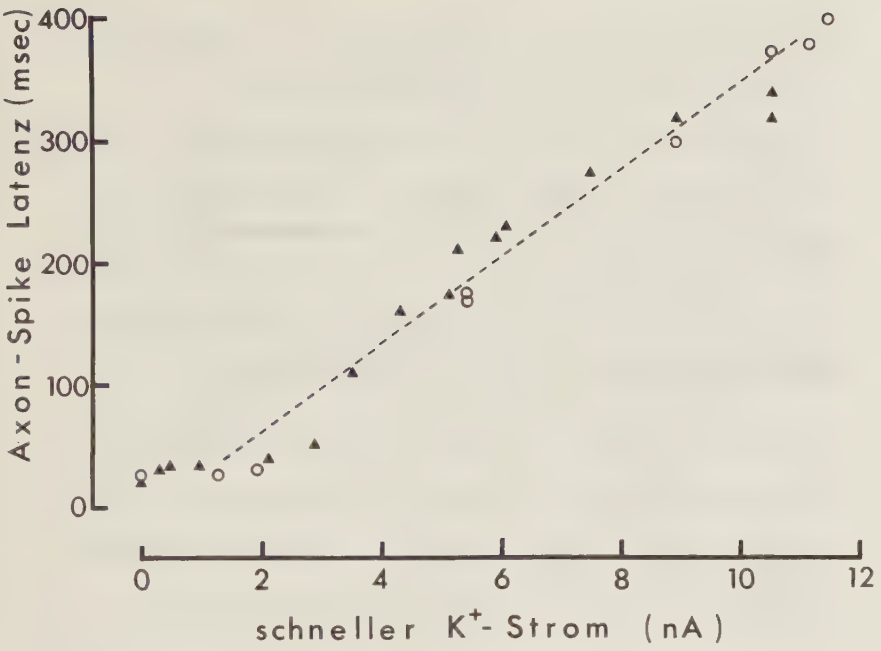


Abb. 22. Die Axon-Spike-Latenz als Funktion der Amplitude des schnellen K^+-Stromes. Es wurden die Daten von Abb. 18 (Kreise) und Abb. 20 (Dreiecke) benutzt.

ohne schnelle K^+-Stromkomponente. (Abb. 17, rechte Spalte).

E. Die langsame hyperpolarisierende Welle

Der Schluß, daß die Wirkung der passiven Polarisation im Axon einen wesentlich geringeren Einfluß auf das Membranpotential (und die Latenzverschiebung der Axonspikes) hat als die Wirkung des schnellen K^+-Stromes,

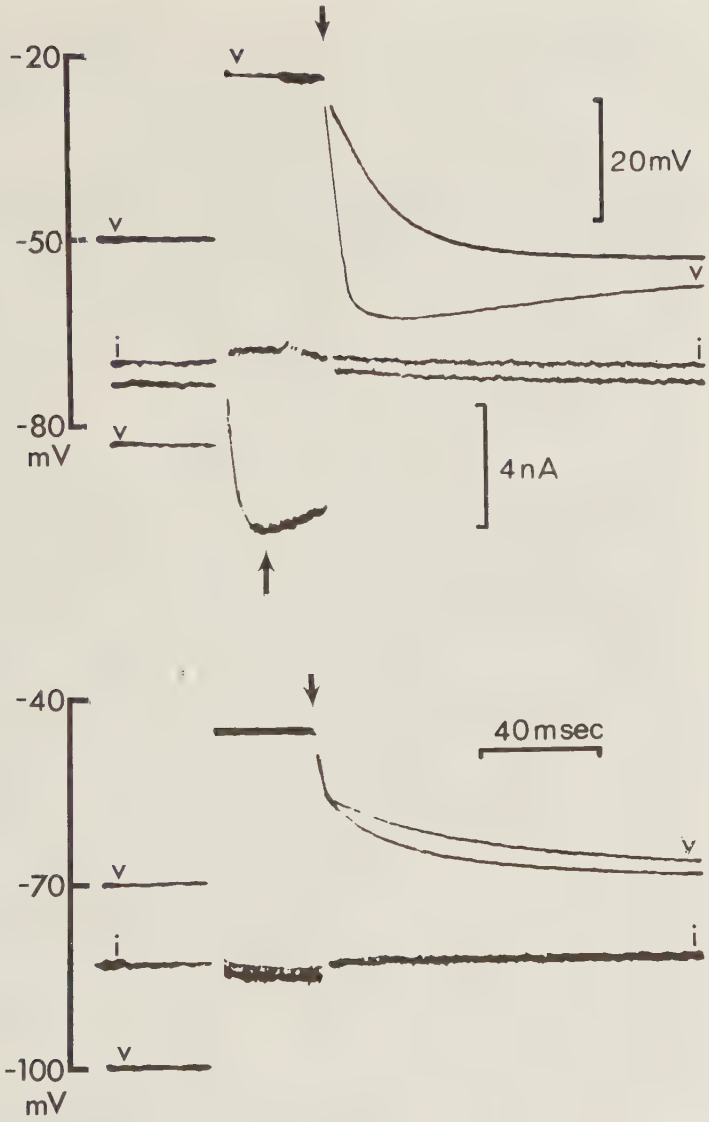
wird auch durch einige Beobachtungen, die ich bei Umschaltexperimenten gemacht habe, bestätigt.

Abb. 23 A zeigt ein solches Umschalt-Experiment in einer Zelle mit starker schneller K^+-Stromkomponente. Von einem Haltepotential von -5o mV ausgehend wurde der Zelle ein Voltage-Clamp-Puls auf -2omV aufgeprägt (oberste Spur) und danach der Voltage Clamp elektronisch ausgeschaltet, d.h. es wurde auf Current-Clamp (s. S. 3o) umgeschaltet, auf ein Haltepotential von ebenfalls -5o mV. Man sieht, daß das Membranpotential rein passiv, mit der Zeitkonstante der Zelle, auf -5o mV zurückgeht. Wenn nun dem Voltage-Clamp-Testpuls ein hyperpolarisierender Vorpuls von 3o mV vorausgeht (jeweils untere Spur), so fließt 1. ein schneller K^+-Auswärtsstrom (Pfeil), 2. verläuft die Repolarisation der Membran nach Ende des Voltage-Clamp-Pulses sehr viel schneller. Sie geht sogar über das Haltepotential hinaus. Die hyperpolarisierende Welle pendelt sich dann langsam auf das Haltepotential ein.

Um nun zu unterscheiden, ob diese Welle durch den schnellen K^+-Strom verursacht wurde, oder durch eine im Axon persistierende passive Polarisation, wurde das

---

Abb. 23. Umschalt-Experiment, Voltage-Clamp bis ↓, dann Current-Clamp. Die Potentialregistrierung ist mit v, die Stromregistrierung mit i gekennzeichnet. Es wurden jeweils 2 Spuren superponiert. In A wurde zuerst von einem Ausgangspotential von - 50 mV ein Testpuls auf - 20 mV appliziert. Danach wurde der gleiche Testpuls (auf -20 mV) von einem



konditionierenden Potential von ca. - 80 mV aus appliziert. In B wurde das gleiche Experiment auf einem um -20 mV verschobenen Potentialniveau wiederholt; es wurde also zuerst ein Testpuls von -70 auf -40 mV appliziert, danach von -100 auf -40 mV.

gleiche Experiment auf einem um 2o mV negativeren Potentialniveau gemacht. In Abb. 23B ist zu sehen , daß bei dem um 2o mV in hyperpolarisierender Richtung verschobenen Potentialverlauf die Schwelle für den schnellen K^+-Strom nicht mehr erreicht wird, und weder mit noch ohne Vorpuls ein Strom fließt. Weiterhin ist bei diesem Experiment nur noch eine Andeutung der langsamen hyperpolarisierenden Welle zu erkennen.

Da der hyperpolarisierende Vorpuls in beiden Experimenten die gleiche Größe hatte, muß man schließen, daß der größte Teil der langsamen hyperpolarisierenden Welle und der sehr beschleunigten Repolarisation eine Wirkung des schnellen K^+-Stromes ist und die passive Polarisation der Membran während des Vorpulses einen vergleichsweise geringen Einfluß auf das Membranpotential nach dem Voltage-Clamp- Testpuls hat. Auch spricht die Größe des Effektes dafür, daß auch in diesem Experiment nicht nur der im Soma vorhandene schnelle K^+-Strom sondern auch der im Axon vorhandene eine Rolle spielt. Von einem schnellen K^+-Strom im Soma allein könnte wegen des großen Faktors (s. S. 36), also wegen des kleinen Eingangswiderstandes des Axons, kaum eine so große Wirkung ausgeübt werden.

In Zellen ohne schnellen K^+-Strom ist übrigens - wie erwartet - auch die langsame hyperpolarisierende Welle nicht vorhanden.

F. Die dominierende Rolle des schnellen K^+-Stromes im Axon

Eine langsame hyperpolarisierende Welle tritt in manchen Zellen in Umschalt-Experimenten auch dann auf, wenn dem hyperpolarisierenden Vorpuls ein Voltage Clamp Testpuls auf nur -5o mV folgt (s. Abb.25, rechts), und im Soma noch kein schneller K^+-Strom aktiviert wird. Daraus kann man schließen, daß der schnelle K^+-Strom im Axon eine niedrigere Schwelle hat als im Soma und auch ohne die Beteiligung des schnellen K^+-Stromes im Soma einen starken Einfluß auf das Potential des Zellsomas hat.

Dies wird auch unterstützt durch die Beobachtung, daß die langsame hyperpolarisierende Welle auch dann auftritt, wenn der schnelle K^+-Strom im Soma schon inaktiviert ist (durch einen längeren Testpuls). Dies ist dadurch zu erklären, daß die Depolarisation des Axons gegenüber der des Somas etwas verzögert abläuft und auch die Inaktivierung des schnellen K^+-Stromes infolgedessen etwas später abgeschlossen ist.

Noch eine weitere Beobachtung weist auf die dominierende Rolle und die niedrigere Schwelle des schnellen K^+-Stromes im Axon hin. In Abb. 24 ist ein Current-Clamp-Experiment mit der Zelle gezeigt, deren Voltage-Clamp-Charakteristiken in Abb. 12 und 13 abgebildet sind. Das Ruhepotential betrug -73 mV; durch einen langen Strompuls wurde die Zelle auf -53 mV depolarisiert. Bei diesem Membranpotential ist der schnelle K^+-Strom

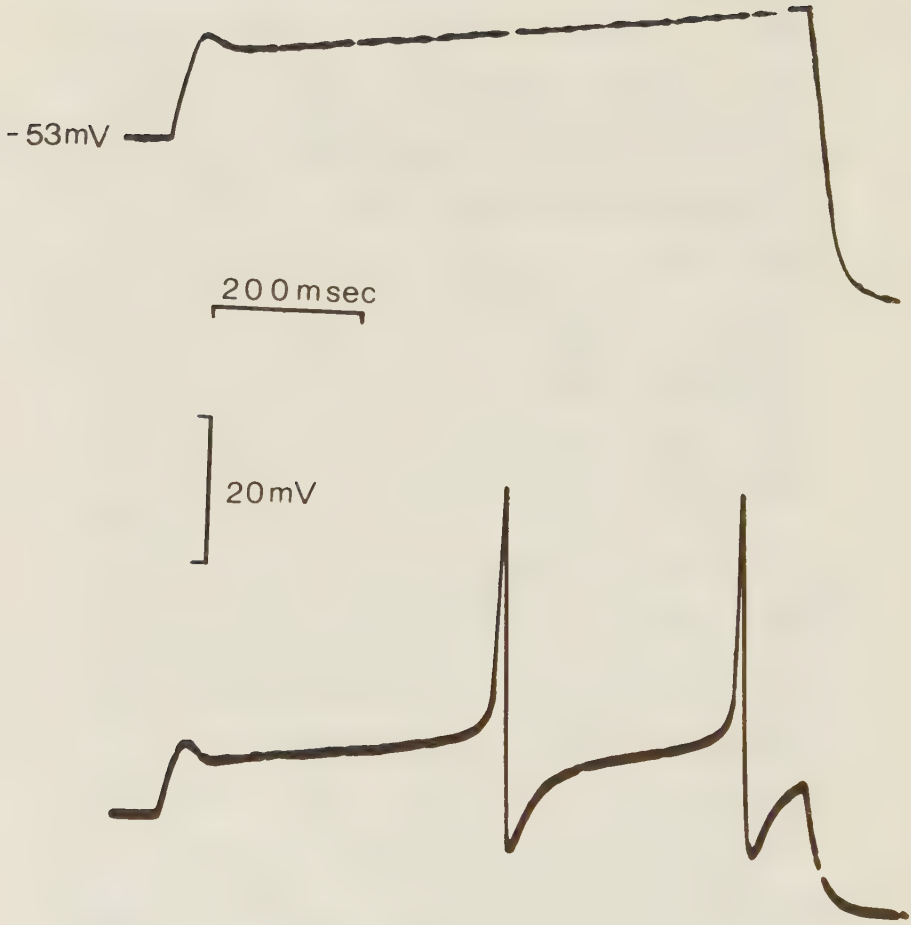


Abb. 24. Current-Clamp-Experiment mit der gleichen Zelle, deren Voltage-Clamp-Charakteristiken in Abb. 12 und 13 abgebildet sind. Ausgehend von einem Membranpotential von -53 mV (wo im Zellsoma der schnelle K^+-Strom vollständig inaktiviert ist, siehe Abb. 13) wurden depolarisierende Strompulse appliziert; in der unteren Spur Injektion eines doppelt so starken Strompulses.

im Soma schon vollständig inaktiviert. Ein zusätzlicher starker depolarisierender Strompuls von 1 sec Dauer konnte jedoch in der Zelle kein Aktionspotential auslösen. Im Spannungsverlauf ist der charakteristische "notch" zu sehen, der auf die Wirkung des schnellen K^+-Stromes zurückzuführen ist. In Abb. 24B sieht man, wie es mit einem noch stärkeren depolarisierenden Strompuls schließlich doch gelingt, ein Aktionspotential nach über 4oo msec auszulösen. Die Hemmwirkung kann in diesem Fall nur durch den schnellen K^+-Strom im Axon verursacht worden sein, da im Soma bei -53 mV Ausgangspotential kein schneller K^+-Strom fließen kann. Auch durch dieses Experiment wird eindeutig das Vorhandensein des schnellen K^+-Stromes im Axon demonstriert. Mit Current Clamp Experimenten ist es oft leichter, die Wirkung auch einer geringen schnellen K^+-Stromkomponente zu entdecken, weil dabei die Mitwirkung des Axons mehr ins Gewicht fällt.

2. Der Einfluß des schnellen K^+-Stromes auf antidrome Spikes

A. Umschalt-Experimente

Um herauszufinden, welche Wirkung der schnelle K^+-Strom auf antidrome Spikes hat, habe ich eine Serie von Umschalt-Experimenten gemacht, d.h. elektronische Um-

schaltung von Voltage-Clamp auf Current-Clamp. Das Voltage-Clamp-Haltepotential und das Current-Clamp-Potential wurden beide auf -5o mV eingestellt. Der Zelle wurden hyperpolarisierende Voltage-Clamp-Pulse von 5oo msec Dauer auf -75 mV aufgeprägt, danach wurde zurückgeklemmt auf -5o mV (Ruhepotential) und nach weiteren 8o msec wurde elektronisch von Voltage-Clamp auf Current-Clamp umgeschaltet. Zu verschiedenen Zeiten nach Ende des hyperpolarisierenden Vorpulses wurden durch Reizung des Analnerven antidrome Spikes ausgelöst.

Nachdem die Zelle für 8omsec auf -5o mV (= Ruhepotential) geklemmt war (zwischen den Pfeilen), befinden sich sowohl Soma als auch Axon immer auf dem gleichen Potential, nämlich -5o mV (= Ruhepotential). Das einzige, was sich während der Current-Clamp-Periode ändert, ist der Aktivationszustand des schnellen K^+-Stromes, der nach Beendigung des Vorpulses mit einem langsamen exponentiellen Zeitverlauf auf Null abfällt (wie z.B. auch in Abb. 13 gezeigt wurde). Auf diese Weise kann die Wirkung des schnellen K^+-Stromes getrennt von der Wirkung der Hyperpolarisation der Zelle dargestellt werden.

In Abb. 25 (rechts) sind die antidromen Spikes abgebildet, die bei Reizung 15o, 2oo, 25o ....55o msec nach Ende des Vorpulses im Zellsoma gemessen wurden. Es sind hier 6 Spuren superponiert, in jedem Durchgang wurde nur ein Reiz gegeben. Man sieht, daß nach dem hyperpolarisierenden Voltage-Clamp-Puls die Amplitude der

antidromen Spikes um fast 3o % verringert ist und daß erst nach 55o msec wieder annähernd der Kontrollwert erreicht ist.

Nach jeder Spur mit hyperpolarisierendem Vorpuls wurde ein Kontrolldurchgang unter genau gleichen Bedingungen, aber ohne Vorpuls,gemacht. Drei dieser Kontrolldurchgänge sind im linken Teil von Abb. 25 zu sehen.

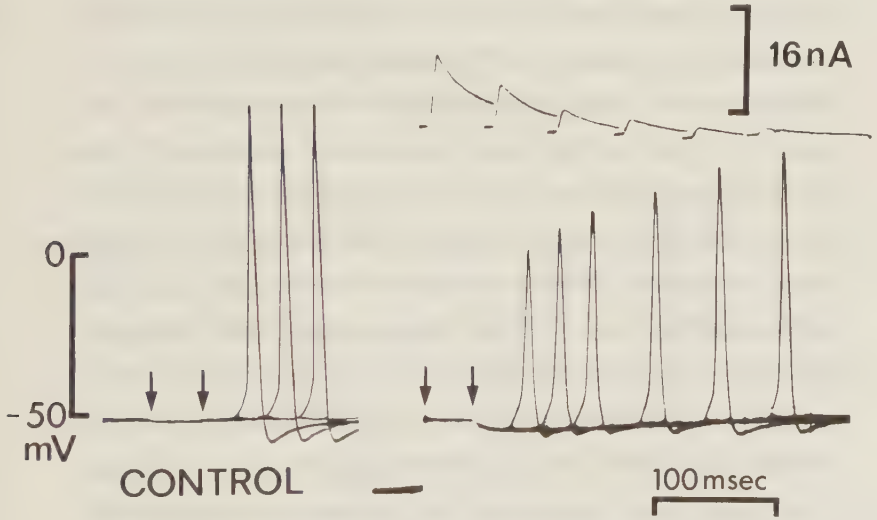


Abb. 25. Umschalt-Experiment, Voltage-Clamp zwischen den senkrechten Pfeilen, danach Current-Clamp und Auslösung antidromer Spikes durch Reizung des Anal-Nerven. Links drei Kontrollen mit antidromer Reizung 150, 200, und 250 msec nach Beginn des 80 msec dauernden Voltage-Clamp-Intervalls. Rechts 6 superponierte Spuren mit hyperpolarisierendem Vorpuls und antidromer Reizung 150, 200, 250, 350, 450, und 550 msec nach Beginn des Voltage-Clamp. Rechts oben sind die Ströme eingesetzt, die bei einem Voltage-Clamp-Experiment mit der gleichen Zelle gemessen wurden, bei dem zu dem entsprechenden Zeitpunkt (bei gleicher Konditionierung) ein Spannungsschritt auf -28,5 mV appliziert vurde.

Zur Veranschaulichung des Abfalls des Aktivationszustandes des schnellen K^+-Stromes nach dem Vorpuls wurden an der gleichen Zelle noch zusätzlich Voltage-Clamp Experimente gemacht, bei denen genau der gleiche Vorpuls und , zu verschiedenen Zeiten nach dem Zurückklemmen auf -5o mV, ein Testpuls auf -28,5 mV gegeben wurde. Die schnellen K^+-Ströme,die durch die Voltage-Clamp Testpulse zu dem jeweiligen Zeitpunkt ausgelöst wurden, sind zur Veranschaulichung des Abfalls des Aktivationszustandes des schnellen K^+-Stromes ebenfalls in Abb. 25 eingesetzt. Es fällt auf, daß der Zeitverlauf, mit dem sich die Größe der im Soma gemessenen antidromen Spikes erholt, fast genau parallel geht mit dem exponentiellen Abfall des Aktivationszustandes des schnellen K^+-Stromes. Da alle anderen Parameter konstant geblieben sind, kann offensichtlich nur der aktivierte schnelle K^+-Strom diese Verkleinerung der Spikes bewirkt haben. Die antidromen Spikes, die sich auf die Region des Axons zubewegen, in der der aktivierte Zustand des schnellen K^+-Stromes noch nicht ganz abgefallen ist, werden natürlich durch die Depolarisation, die sie bewirken, den schnellen K^+-Strom anschalten und sich somit selbst kurzschließen. Dieser Kurzschluß der antidromen Spikes durch das Anschalten der erhöhten K^+-Leitfähigkeit und der hyperpolarisierende drive des schnellen K^+-Stromes sind die Ursache für die Verkleinerung der antidromen Spikes.

B. Die Wirkung der Hyperpolarisation der Zelle auf antidrome Spikes

Noch drastischer sind die Effekte, die eine Hyperpolarisation der Zelle (unter Current-Clamp-Bedingungen) auf die Amplitude der antidromen Spikes hat. Wie in Abb. 26 zu sehen ist, wird mit zunehmender Hyperpolarisation der Zelle die Amplitude der antidromen Spikes und ihre Abfallsgeschwindigkeit kontinuierlich kleiner, bis schließlich bei einem Potential von -9o mV die Größe des im Soma gemessenen antidromen Spikes fast auf 1o % seiner normalen Amplitude verkleinert ist.

Das ist genau das Gegenteil von dem, was man in fast allen anderen Nervenzellen sieht, wo nämlich die Amplitude der antidromen Spikes größer wird, wenn man die Zelle hyperpolarisiert. Der Schluß liegt nahe, daß der schnelle K^+-Strom für diesen Effekt verantwortlich ist. Antidrome Spikes können im Gegensatz zu orthodrom ausgelösten Axonspikes (s. Abb. 9) nicht durch Hyperpolarisation des Somas vollständig unterdrückt werden. Aber durch die Wirkung des schnellen K^+-Stromes wird die regenerative Antwort der Membran des Axons, also die aktive Fortleitung der antidromen Spikes, an weiter vom Soma entfernt liegenden Stellen abgeblockt.

Wie aus Abb. 26 zu ersehen ist, ist der Unterschied in der Amplitude bei den 5 oberen Spikes sehr groß, während zwischen den beiden untersten Spuren kaum noch ein Unterschied besteht. Diese Beobachtung spiegelt ge-

nau den Verlauf der Inaktivationskurve (s. Abb. 13) wieder.

Anomale Gleichrichtung ist in den hier untersuchten Zellen nicht vorhanden, wie man aus der Proportionalität der Strompulse und der Spannungsauslenkungen in der Zelle sieht.

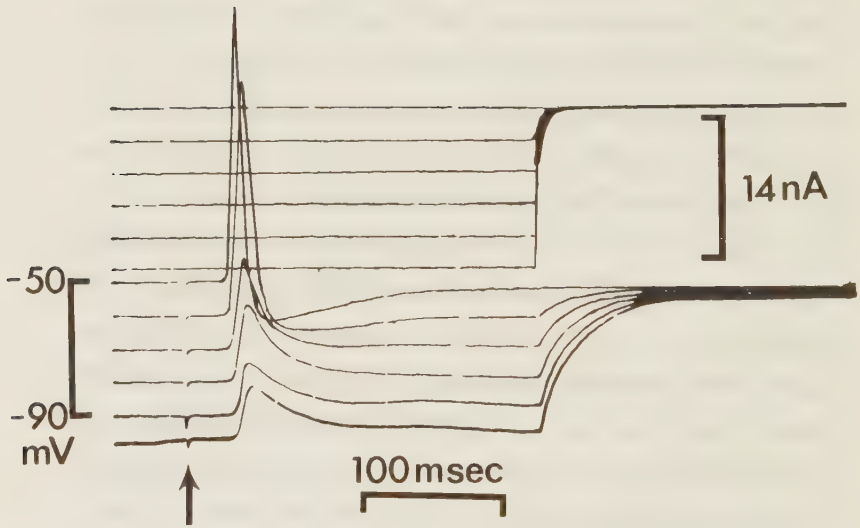


Abb. 26. Antidrome Spikes, ausgelöst durch Reizung des Anal-Nerven. Durch hyperpolarisierende Strompulse von 2 sec Dauer wurden verschiedene Membranpotentiale eingestellt.

3. Der Einfluß des schnellen K^+-Stromes auf EPSPs

a. Umschalt-Experimente

Um die Wirkung des schnellen K^+-Stromes auf starke Salven von EPSPs zu untersuchen, habe ich Umschalt-Experimente nach dem gleichen Prinzip wie in Kap. V 2A bei antidromen Spikes gemacht.

Abb. 27 zeigt den typischen Verlauf eines solchen Experimentes. Das Current-Clamp-Haltepotential der Zelle war -5o mV. Durch einen Strompuls von 2 sec Dauer wurde die Zelle auf -72 mV hyperpolarisiert; dann wurde das Potential durch einen Voltage-Clamp-Puls wieder auf -5o mV zurückgeführt. Nach weiteren 8o msec wurde auf Current-Clamp umgeschaltet. Zu verschiedenen Zeiten, nach Ende des konditionierten Pulses, wurde nun durch Reizung der Analnerven eine große Salve von EPSPs ausgelöst.

Das Zeitinterval zwischen Vorpuls und Reiz ist in msec in Abb. 27 eingetragen.

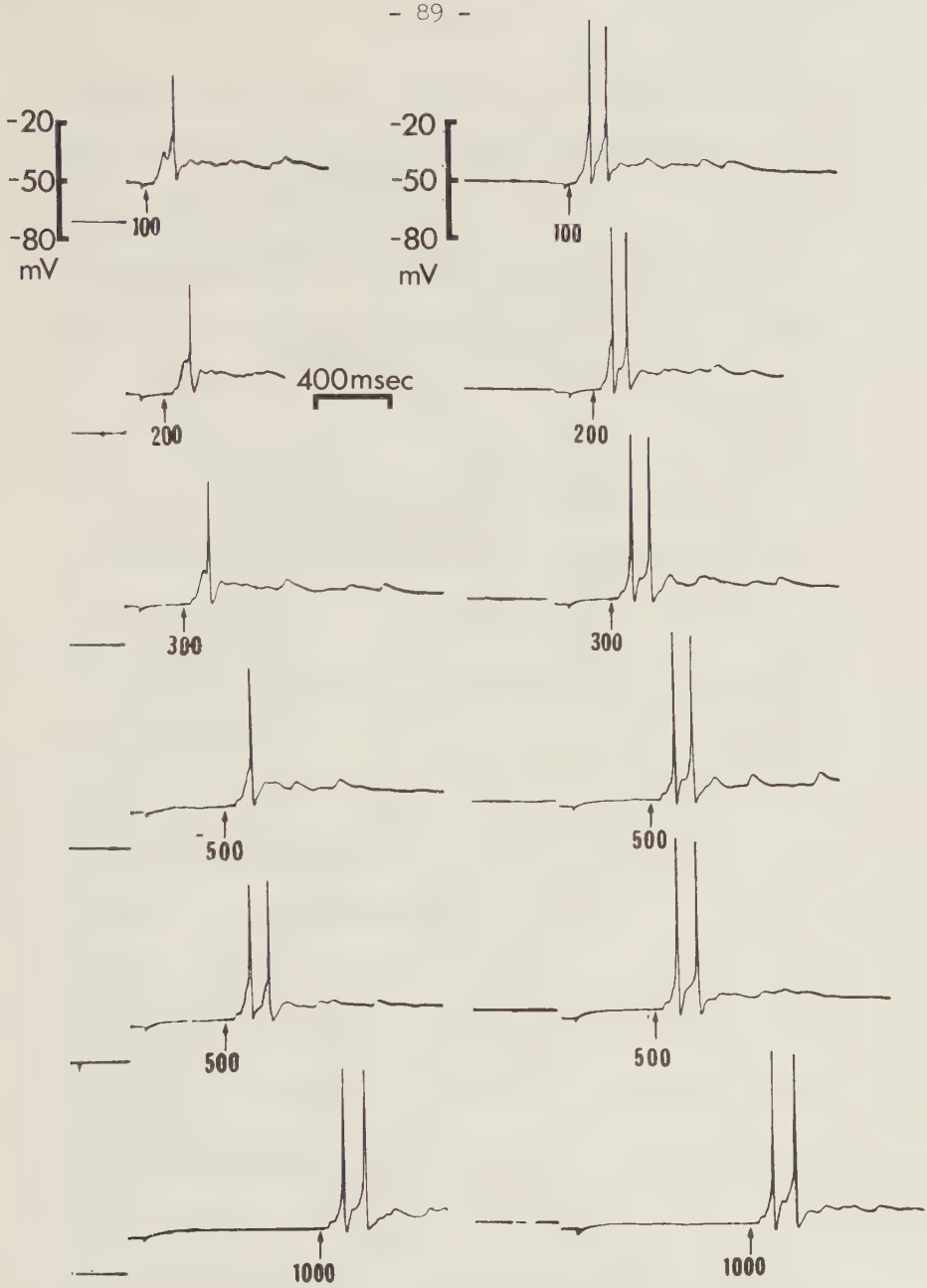
Es wurde so vorgegangen, daß ein Reiz zu einem bestimmten Zeitpunkt immer zuerst mit Vorpuls und sofort anschließend ohne Vorpuls (Kontrolle, rechte Spalte) gegeben wurde. Fehler, die aus einer zeitlichen Veränderung der erregenden synaptischen Salve entstehen könnten, wurden durch die jeweils sofort anschließende Kontrolle vermieden. Starke orthodrome Reize werden oft mit der Zeit etwas schwächer; deshalb wurde die Reihenfolge des Vorgehens so gewählt, daß zuerst der Reiz

mit Vorpuls und danach der gleiche Reiz ohne Vorpuls gegeben wurde. Wenn also der zweite Reiz etwas geringer ist, wird in diesem Fall die Wirkung des hyperpolarisierenden Vorpulses (nämlich die Verkleinerung des synaptischen inputs) geringer erscheinen als sie in Wirklichkeit ist. Systematische Fehler, die zu einer Überschätzung der Wirkung des schnellen K^+-Stromes führen könnten, werden auf diese Weise ausgeschlossen.

Wie aus Abb. 27 zu ersehen ist, hat die Aufhebung der Inaktivierung des schnellen K^+-Stromes durch einen hyperpolarisierenden Vorpuls auch eine starke Wirkung auf synaptische Erregung. In den ersten 500 msec nach dem Vorpuls löst der starke synaptische Reiz jeweils nur einen verkleinerten Spike aus, während in den Kontrollen ohne Vorpuls immer zwei volle Spikes ausgelöst werden. Sogar die EPSPs und die Axonspikes, die den Spikes nachfolgen, erscheinen in den Kontrolldurchgängen etwas größer, obwohl natürlich durch einen Spike der schnelle K^+-Strom zum größten Teil inaktiviert wird.

→

Abb. 27. Umschalt-Experiment. Konditionierung durch einen Voltage-Clamp-Puls von -50 auf -72 mV von 2 sec Dauer, danach Zurückklemmen auf das Ruhepotential (-50 mV), nach 80 msec Umschaltung auf Current-Clamp. Danach orthodrome Reizung (am Anal-Nerven, dessen dicke efferente Fasern durchtrennt waren); die Zahlen bezeichnen das Zeitintervall zwischen Ende des hyperpolarisierenden Vorpulses und Reizung des Nerven (Pfeil). Die Kontrollen ohne Vorpulse sind in der rechten Spalte abgebildet.


-20
-50
-80
mV
100
200
400msec
300
500
500
1000
-20
-50
-80
mV
100
200
300
500
500
1000

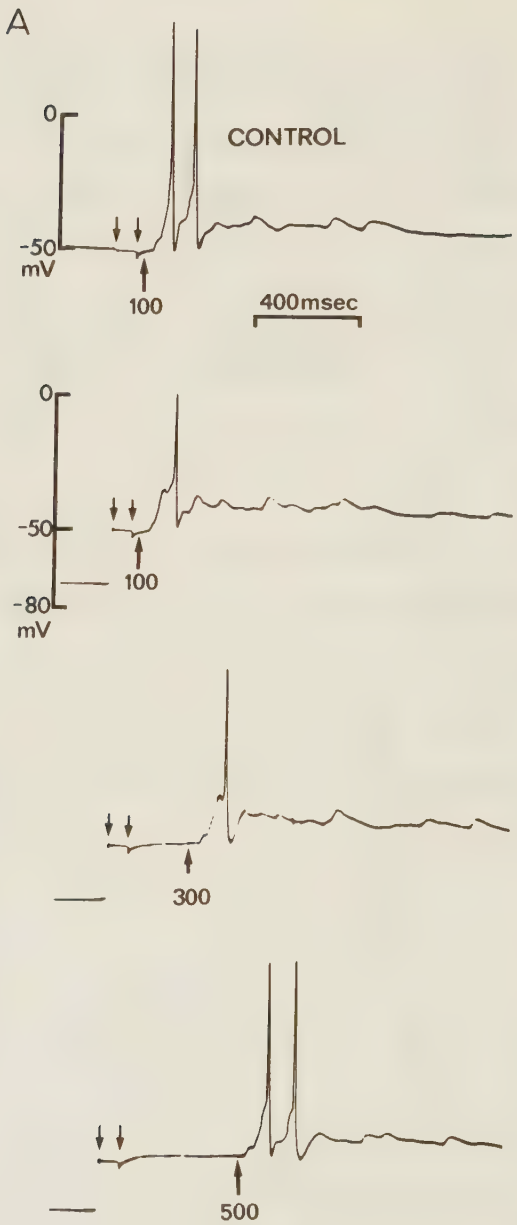


Abb. 28. Stärker vergrößerte Abbildung einzelner Spuren aus dem Experiment von Abb. 27. Zwischen den senkrechten Pfeilen Voltage-Clamp auf -50 mV, danach Umschaltung auf Current-Clamp.

Selbst nach 5oo msec ist noch eine Hemmwirkung durch den konditionierten Vorpuls festzustellen, entweder es wird nur ein Spike ausgelöst, oder es werden zwei Spikes ausgelöst, von denen der erste kleiner ist als der (immer noch verkleinerte) zweite Spike. Der volle synaptische Input ist nach 1ooo msec wieder hergestellt. Die Abnahme der Hemmwirkung mit der Zeit verläuft also, ähnlich wie in Abb. 27, in etwa parallel mit der Inaktivierung des schnellen K^+-Stromes. In Abb. 28 sind einige der Spuren noch einmal in stärkerer Vergrößerung dargestellt. Man sieht, daß der Aufstrich der Spikes 1oo und 3oo msec nach Ende des Vorpulses durch einen kleinen notch unterbrochen ist.

In anderen Zellen, wo sehr langsam ansteigende und weit entfernte EPSPs vorhanden sind, manifestiert sich die Wirkung des schnellen K^+-Stromes nur darin, daß die Anzahl der durch den gleichen orthodromen Reiz ausgelösten Spikes umso mehr verringert ist, je mehr der schnelle K^+-Strom aktiviert ist. Dies ist in Abb. 29 zu sehen. Die Spuren wurden in der Reihenfolge A, B, C, D, aufgenommen; es könnte also eine eventuelle zeitliche Verringerung des synaptischen Reizes allenfalls zu einer Unterschätzung der Wirkung des schnellen K^+-Stromes führen.

B. Hyperpolarisation der Zelle

Völlig anders, und auf den ersten Blick überraschend,

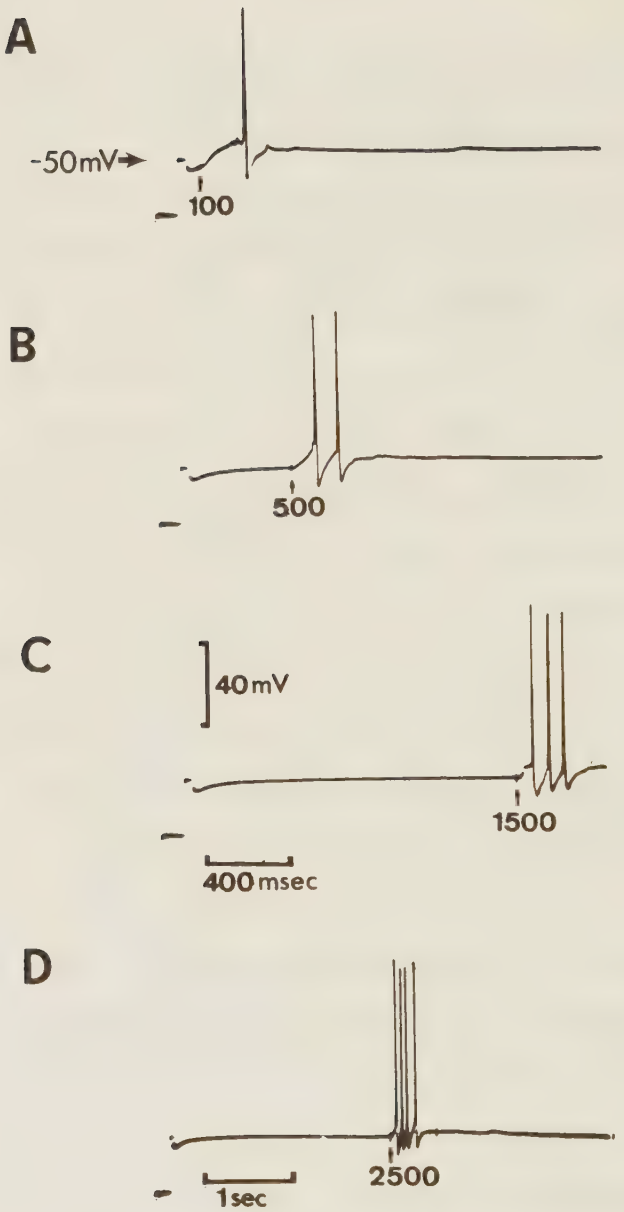


Abb. 29. Umschalt-Experiment. Konditionierender Vorpuls von 2 sec Dauer von -50 auf -75 mV, danach Zurückklemmen auf -50 mV und Umschaltung auf Current-Clamp. Die Zahlen bezeichnen das Zeitintervall (in msec) zwischen Vorpuls und Nervenreiz.

ist die Situation, wenn man den schnellen K^+-Strom durch dauernde Hyperpolarisation der Zelle in den aktivierten Zustand bringt und durch geeignete Einstellung der Reizstärke einzelne orthodrome EPSPs erzeugt.

Abb. 30 zeigt das gleiche Experiment wie Abb. 26, nur ist die Reizstärke etwas erhöht, so daß zusätzlich zu dem antidromen Spike noch ein einzelnes orthodromes

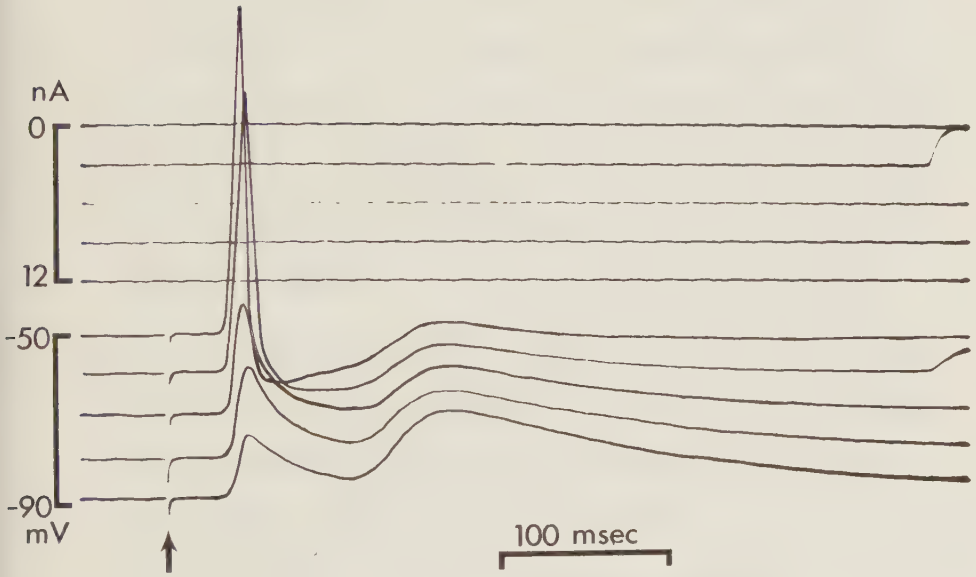


Abb. 30. Antidrome Spikes und EPSPs bei verschiedenen Membranpotentialen. Gleiches Experiment wie Abb. 26, jedoch wurde die Reizstärke leicht erhöht, sodaß zusätzlich eine afferente Faser gereizt wurde; außerdem wurde die Dauer der hyperpolarisierenden Strompulse in den 3 untersten Spuren etwas verlängert, damit der Abfall der EPSPs vollständig zu sehen ist.

EPSP ausgelöst wird. Im Gegensatz zu dem antidromen Spike wird das EPSP mit zunehmender Hyperpolarisation grösser. Die Spannungsabhängigkeit einzelner EPSPs ohne vorausgehenden antidromen Spike ist auch in Abb. 9B zu sehen.

VI. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob der schnelle K^+-Strom einen Einfluß auf die synaptische Übertragung hat, und welche "Funktion" dieser Einfluß gegebenenfalls hat. Die in Kapitel V1 beschriebenen Experimente zeigen, daß der schnelle K^+-Strom auch im Axon vorhanden ist. Die in Kapitel V2 und V3 geschilderten Resultate zeigen, daß der schnelle K^+-Strom im Axon eine starke hemmende Wirkung auf antidrome bzw. synaptische Erregung haben kann.

Um eine eindeutige Interpretation der Resultate zu ermöglichen, war es sehr wichtig, die Wirkung des schnellen K^+-Stromes von der Wirkung der passiven Polarisation der Zellmembran, die ja für die Aktivierung des schnellen K^+-Stromes notwendig ist, zu unterscheiden. Sowohl in den Axonspike-Experimenten als auch in den Umschalt-Experimenten war es möglich, diese beiden Parameter zu trennen, und zwar durch Ausnutzung der Tatsache, daß die Aktivation bzw. Inaktivation des schnellen K^+-Stromes einen sehr langsamen Zeitverlauf hat, im Vergleich zu der schnellen Umpolung der Membran durch Voltage-Clamp-Schritte.

Erst nachdem so gezeigt worden war, daß eine Veränderung des Aktivationszustandes des schnellen K^+-Stromes allein, bei konstantem Membranpotential, eine so stark hemmende Wirkung zur Folge haben kann, war die Interpretation der einfacheren Experimente, in denen die Zelle einfach durch Strominjektion hyperpolarisiert wurde, eindeutig.

Wie in Kapitel V3 gezeigt wurde, bewirkt eine Hyperpolarisation der Zelle eine Zunahme der Amplitude von EPSP (Abb. 3o, Abb. 9), jedoch eine Abnahme der Amplitude von antidromen Spikes (Abb. 26 und 3o). Das erscheint auf den ersten Blick paradox. Durch Hyperpolarisation der Zelle wird die Inaktivation des Einwärtsstromes verringert, das sollte eher eine Vergrösserung der Spike-Amplitude zur Folge haben.

Eine mögliche Ursache, die für diesen Effekt in Frage käme, wäre eine erhöhte kapazitive Beladung des Axons, d.h. die vergrößerte Ladungsmenge (von der Kapazität der Somamembran), die durch die ankommenden antidromen Spikes verschoben werden muß, könnte zu einer Verringerung der Amplitude der Spikes führen. Jedoch wurde weder in dem Bereich zwischen -3o und -5o mV (wo der schnelle K^+-Strom völlig inaktiviert ist), noch im Bereich über -8o mV (s. Abb. 26) eine Verringerung der Spike-Amplitude beobachtet. Außerdem ist dieser Effekt in Zellen, die keine schnelle K^+-Stromkomponente haben, nicht vorhanden. Diese Befunde machen es sehr unwahrscheinlich, daß die "capacitive load" bei der Ver-

ringerung der Spike-Amplitude in den hier untersuchten Neuromen eine Rolle spielt.

Auch normale Gleichrichtung, d.h. eine Erhöhung der Ruheleitfähigkeit der Membran bei Hyperpolarisation, kann nicht zur Erklärung der beobachteten Phänomene herangezogen werden. Wie nämlich aus Abb. 9, 26 und 3o zu ersehen ist, ist keine anomale Gleichrichtung in den hier untersuchten Zellen vorhanden.

Eine sehr einfache und einleuchtende Erklärung für die beschriebenen Resultate bietet sich an, wenn man sie zu der S-förmigen Inaktivationskurve des schnellen K^+-Stromes (Abb. 13 und 18) in Beziehung bringt. Zwischen -5o und -75 mV ruft jede - selbst geringfügige - Änderung des Membranpotentials eine sehr starke Änderung des Aktivationszustandes des schnellen K^+-Stromes hervor. Wenn nun eine Depolarisation (durch starke synaptische Erregung oder sich dem Soma nähernde antidrome Spikes) die Schwelle des schnellen K^+-Stromes (ca. -5o mV) überschreitet, wird dies, entsprechend dem Aktivationszustand des schnellen K^+-Stromes, einen mehr oder weniger stark hemmenden Effekt hervorrufen, nämlich durch den shunt (die K^+-Leitwerterhöhung) im Axon und durch den hyperpolarisierenden "drive" des resultierenden K^+-Auswärtsstromes.

Auf diese Weise kann die Effizienz des erregenden synaptischen Inputs in die Zelle durch sehr kleine Änderungen des Membranpotentials moduliert werden. Dieser Mechanismus ist auch die Erklärung für eine andere Beob-

achtung, nämlich, daß es sehr schwer ist, durch orthodrome Reizung in diesen Zellen Aktionspotentiale auszulösen, wenn das Membranpotential negativer als -5o mV ist. Selbst mit sehr starken elektr. Einzelreizen, die am Anal-,Visceral- oder rechten Pallialnerven appliziert wurden, gelang es fast nie, in den Zellen Aktionspotentiale auszulösen, wenn sie ein hohes Membranpotential hatten. (Bei repetitiver Reizung kam es jedoch unter diesen Bedingungen zur Auslösung von Aktionspotentialen). Ein recht eindeutiger Befund, der die These unterstützt, daß die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte dem schnellen Kaliumstrom zuzuschreiben sind, und daß die passive Hyperpolarisation eine untergeordnete Rolle spielt, ist das Fehlen der Axonspike-Latenzverschiebung und aller anderen hemmenden Effekte in Zellen, die keinen schnellen K^+-Strom besitzen (Abb. 17).

Bei kleinen EPSPs ist jedoch die Situation anders. Ihre Amplitude ist bei Hyperpolarisation vergrößert, wie aus Abb. 9 und 3o zu ersehen ist. Auch das läßt sich leicht durch die Charakteristiken des schnellen K^+-Stromes erklären. Er wird nur dann aktiviert, wenn eine Depolarisation seine Schwelle (-5o mV), überschreitet (Abb. 13B). Wenn nun die Zelle hyperpolarisiert wird, werden die "peaks" von kleinen einzelnen EPSPs die -5o mV-Schwelle nicht mehr erreichen, was zur Folge hat, daß sie überhaupt nicht durch den schnellen K^+-Strom beeinflußt werden.

Ganz anders verhält es sich mit starken Salven von

EPSPs, die die Zelle so weit depolarisieren, daß sie bei niedrigem Membranpotential (also bei inaktiviertem K^+-Strom) Aktionspotentiale auslösen. Wenn in diesem Falle die Zelle hyperpolarisiert wird, wird die starke synaptische Depolarisation den schnellen Kaliumstrom aktivieren und sich damit selbst hemmen. Bildlich gesprochen tritt der schnelle Kaliumstrom also nur dann in Aktion, wenn dies nötig ist, um die Auslösung von Aktionspotentialen zu verhindern.

Eine solche Art von Hemmung wäre auch vom Energiebedarf her gesehen weit günstiger als der von Kandel und Tauc (1966) beschriebene Mechanismus der Verringerung des synaptischen Inputs durch permanente Leitwerterhöhung bei Hyperpolarisation (anomale Gleichrichtung). Ein ständig erhöhter Leitwert erfordert nämlich auch eine ständig erhöhte metabolische Pumpaktivität, um die Ionenkonzentrationsdifferenz über der Membran aufrecht zu erhalten.

Die hier postulierte Wirkung des schnellen K^+-Stromes auf erregende synaptische Potentiale stellt eine neue Art von Hemmung dar, die sich von den bis jetzt in der Neurophysiologie bekannten Hemmungsvorgängen grundsätzlich unterscheidet. Bei der postsynaptischen Hemmung handelt es sich um eine der Zelle von außen, durch den von einer anderen Zelle ausgeschütteten hemmenden Transmitter, aufgeprägte zeitweise Verringerung der Erregbarkeit. Die Hemmung durch den schnellen K^+-Strom wird aber von der zu hemmenden Zelle selbst verursacht, und

zwar ist zum An- und Abschalten der Hemmung nur eine leichte Veränderung des Membranpotentials notwendig.

Die Zelle kann also ihre "Erregbarkeit", mit anderen Worten ihre "Input-Output-Charakteristik" für beliebig Zeiten (im Gegensatz zu IPSPs) selbst regulieren. Solche Mechanismen, mit denen Nervenzellen ihren "Funktionszustand" ändern können, so wichtig sie für synaptische Integration auch sind, sind bisher weitgehend unbekannt.

Das bringt uns zu der Frage, in wieweit diese Hemmung in vivo überhaupt vorkommt und was, teleologisch gesprochen, ihre eigentliche "Funktion" ist. Im Kapitel V wurde gezeigt, daß zwischen -55 und -65 mV - also im steilen Bereich der Inaktivationskurve -schon eine geringfügige Änderung des Membranpotentials eine sehr starke Änderung der Effizienz des synaptischen (oder antidromen) Inputs hervorrufen k a n n. Es bleibt nun nur noch zu klären, ob das Membranpotential sich auch in vivo in dem kritischen Bereich bewegt.

Das ist in der Tat der Fall. Die Membranpotentiale, die in den untersuchten Zellen (einige hundert) gefunden wurden, lagen genau im Bereich der Inaktivationskurve des schnellen K^+-Stromes, nämlich zwischen -5o und -75mV. Der Durchschnitt lag zwischen -5o und -6o mV bei 14°C; bei höheren Temperaturen sind die Membranpotentiale jedoch noch etwas höher. Auch langsame "spontane" Fluktuationen des Membranpotentials, eine starke Temperaturabhängigkeit und eine vorübergehende Hyperpolarisation

der Zelle nach starker Reizung wurden häufig beobachtet. Diese Phänomene sind wahrscheinlich auf die Wirkung von elektrogenen Ionenpumpen zurückzuführen.

Wie aus den Arbeiten von Carpenter, Moreton, Kerkut und Thomas, Russell und Brown etc. bekannt ist, tragen die metabolischen Pumpen, besonders die Na^+-Pumpe, sehr wesentlich zum Membranpotential der Zellen bei. Aber nicht nur Na^+-Ionen, sondern auch Chlor- und Kalimionen werden aktiv transportiert. Der Beitrag der elektrogenen Pumpen zum Membranpotential ist sehr variabel, weil er sowohl von der metabolischen Aktivität der Zellen als auch von der Temperatur abhängig ist.

Da also Schwankungen des Membranpotentiales in dem für den Aktivationszustand des schnellen K^+-Stromes kritischen Bereich sehr wohl vorkommen, und drastische Änderungen der Aktivität der Zellen zur Folge haben, ist es naheliegend, zu postulieren, daß die daraus resultierende Modulation der synaptischen Aktivität tatsächlich ein "erwünschter", nützlicher Effekt ist. Ein weiterer Hinweis dafür, daß die "Funktion" des schnellen K^+-Stromes eine Hemmung des synaptischen Inputs ist, ist der Befund, daß niemals hemmende postsynaptische Potentiale in den Zellen mit schneller K^+-Stromkomponente gefunden wurden, während sie in dem Bündel von Zellen, in dem der schnelle K^+-Strom nicht vorhanden ist, regelmäßig angetroffen wurden.

Ob eine "in die Membran eingebaute" Hemmung durch eine zeit- und spannungsabhängige Leitwertänderung vom

Hodgkin-Huxley-Typ auch bei anderen Tieren vorkommt, ist nicht bekannt. Wie oben ausgeführt wurde, ist diese Hemmung auch leicht zu übersehen, oder falsch zu interpretieren, wenn man die Voltage-Clamp-Eigenschaften der Zellen nicht kennt. Auf jeden Fall sollte auch bei höheren Tieren eine zeit- und spannungsabhängige Leitwertänderung der Membran als ein möglicher Mechanismus zur Modulation synaptischer Erregung in Betracht gezogen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

Amoroso, E.C., Baxter, M.I., Chiquoine A.P., Nisbet, R.H. (1964) The fine structure of neurons and other elements in the nervous system of the giant African land snail Archachatina marginata. Proc. Roy. Soc. B 160:167.

Armstrong, C., Hille, B., (1972) J.Gen. Physiol. 59:388.

Barker, D.L., Herbert, E., Hildebrand, J.G., Kravitz, E. (1972) Acetylcholine and lobster sensory neurones. J. Physiol. 226:205.

Carew, T.J., Castellucci, V.F., Kandel, E.R. (1971) An analysis of dishabituation and sensitization of the gill withdrawal reflex in Aplysia. Int. J. Neuroscience 2:79.

Carpenter, D.O., (1970) Membrane potential produced directly by the Na^+-pump in Aplysia neurons. Comp. Biochem. Physiol. 35:371.

Cedar, H., Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1972) Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of Aplysia californica. I. Increased synthesis in response to synaptic stimulation. J. Gen. Physiol. 60:558.

Chalazonitis, N., Arvanitaki, A. (1966) L' espace gliosomatique dans les ganglions d' Aplysia et diffusibilité de l´oxygène. C. R. Soc. Biol. (Paris) 160:1897.

Chamberlain, S.G., Kerkut, G.A. (1969) Voltage clamp analysis of the sodium and calcium inward currents in snail neurones. Comp. Biochem. Physiol. 28:787.

Coggeshall, R.E. (1967) A light and electron microscope study of the abdominal ganglion of Aplysia californica. J. Neurophysiol. 30:1263.

Cole, K.S. (1968) Membranes, ions, and impulses, Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles.

Cole, K.S., Hodgkin, A.L. (1939) Membrane and protoplasm resistance in the squid giant axon. J. Gen. Physiol. 22:671.

Cole, K.S. (1949) Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. Arch. Sci. Physiol. 3:253.

Connor, J.A., and C.F. Stevens. 1971 a.Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. J. Physiol. (London) 213:1.

Connor, J.A., and C.F. Stevens. 1971 b. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. J. Physiol. (London) 213:21.

Connor, J.A., and C.F. Stevens. 1971 c. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. J. Physiol. (London) 213:31.

Del Castillo, J., Katz, B. (1955) On the localization of acetylcholine receptors. J. Physiol. 128:157.

Faber, D.S., Klee, M.R. (1972) Membrane characteristics of bursting pacemaker neurones in Aplysia. Nature New Biol. 240:29.

Gerschenfeld, H.M., (1972a) Acetycholine transmission at central synapses of Mollusca - a survey. In: Structure and function of synapses, Pappas, G.D., Purpura, D., (ed.),

Gerschenfeld, H.M. (1972 b) Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. Physiol. Rev. 53:1.

Gerschenfeld, H.M., Stefani, E. (1968) Evidence for an excitatory transmitter role of serotonin in molluscan central synapses. Advanc. Pharmacol. 6A:369.

Gerschenfeld, H.M., Tauc, L. (1964) Différents aspects de la pharmacologie des synapses dans le système nerveux central des Mollusques. J. Physiol. (Paris) 56:360.

Gola, M., Romey, G. (1971) Responses anomales à dès courants sous-liminaires de certaines membranes somatiques (neurones géants d' Helix pomatia), analysé par la méthode du voltage imposé. Pflügers Arch. 327:105.

Gorman, A.L.F., Mirolli, M., (1970) Axonal localization of an excitatory postsynaptic potential in a molluscan neurone. J. Exp. Biol. 53:727.

Gorman, A.L.F., Mirolli, M. (1972) The passive electrical properties of the membrane of a molluscan neurone. J. Physiol. 227:35.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952a) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116:449.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952b) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116:473.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952c) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116:497.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952d) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117:500.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B. (1952) Measurement of current voltage relation in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. 116:424.

Kandel, E.R., Tauc, L. (1965) Mechanisms of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of Aplysia depilans. J. Physiol. 181:28.

Kandel, E.R., Tauc, L. (1966) Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequences for synaptic transmission. J. Physiol. 183:287.

Katz, B., Miledi, R. (1965) The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. Proc. Roy. Soc. B 161:483.

Kehoe, J.S. (1972a) Ionic mechanism of a two component cholinergic inhibition in Aplysia neurones. J. Physiol. 225:85.

Kehoe, J.S. (1972b) Three acetylcholine receptors in Aplysia neurones. J. Physiol. 225:115.

Kehoe, J.S. (1972c) The physiological role of three acetylcholine receptors in Aplysia neurones. J. Physiol. 225:147.

Kerkut, G.A., Brown, L.C., Walker, R.J. (1969) Cholinergic IPSP by stimulation of the electrogenic sodium pump. Nature 223:864.

Kerkut, G.A., Meech, R.W. (1966) The internal chloride concentration of the H- and D- cells in the snail brain. Comp. Biochem. Physiol. 19:819.

Kerkut, G.A., Walker, N.A. (1962) The specific chemical sensitivity of Helix nerve cells. Comp. Biochem. Physiol. 7:277.

Kernell, D., Peterson, R.P. (1970) Effects of spike activity versus synaptic activation on metabolism of ribonucleic acid in a molluscan giant neurone. J. Neurochem. 17:1087.

Jacobsen, M., (1971) Handbook of Sensory Physiology I, 166; W.R. Loewenstein, ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A., Pidoplichko, V.I. (1972) Potentialdependent membrane current during the active transport of ions in snail neurones. J. Physiol. 226:373.

Levitan, H., Tauc, L. (1972) Acetylcholine receptors: topographic distribution and pharmacological properties of two receptor types on a single molluscan neurone. J. Physiol. 222:537.

Lux, H.D., Loracher, C., Neher, E., (1970) The action of ammonium on postsynaptic inhibition of cat spinal motoneurons. Exp. Brain Res. 11:431.

Meves, H. (1968) The ionic requirements for the production of action potentials in Helix pomatia neurons. Pflügers Arch. 304:215.

Miledi, R. (1960a) The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibres after complete or partial denervation. J. Physiol. 151:1.

Miledi, R. (1960b) Properties of regenerating neuromuscular synapses in the frog. J. Physiol. 154:190.

Mirolli, M., Talbott, S.R. (1972) The geometrical factors determining the electrotonic properties of a molluscan neurone. J. Physiol. 227:19.

Mirolli, M., Gorman, A.L.F., (1973) The extracellular space of a simple molluscan nervous system and its permeability to potassium. J. exp. Biol.

Marmont, G. (1949) Studies on the axon membrane; I. A new method. J. Cell. Comp. Physiol. 34:351.

Moreton, R.S. (1969) An investigation of the electrogenic sodium pump in snail neurones, using the constant field theory. J. Exp. Biol. 51:181.

Neher, E. (1970) Dynamische Eigenschaften von Nervensoma-membranen (Dissertation), Techn. Hochschule München.

Neher, E. (1971) Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurons. J. Gen. Physiol. 58:36.

Neher, E., Lux, H.D. (1969) Voltage clamp on Helix pomatia neuronal membrane; current measurement over a limited area of the soma surface. Pflügers Arch. 311:272.

Neher, E., Lux, H.D. (1972) Differential action of TEA^+ on two K^+-current components of a molluscan neurone. Pflügers Arch. 336:87.

Neher, E., Lux, H.D. (1973) Rapid changes of potassium concentration at the outer surface of exposed single neurons during membrane current flow. J. Gen. Physiol. 61:385.

Peterson, R.P., Kernell, D. (1970) Effects of nerve stimulation on metabolism of ribonucleic acid in a molluscan giant neurone. J. Neurochem. 17:1075.

Rall, W. (1960) Membrane potential transients and membrane time constant of motoneurons. Exp. Neurol. 2:503.

Rall, W. (1964) Theoretical significance of dendritic trees for neuronal input-output relations. In: Reiss, R. (ed.) Neural theory and modeling; Stanford Univ. Press, Stanford, Calif.

Rall, W. (1967) Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different somadendritic distributions os synaptic input. J. Neurophysiol. 30:1138.

Rall, W., Burke, R.E., Smith, T.G., Nelson, P.G., Frank, K. (1967) Dendritic location of synapses and possible mechanism for the monosynaptic EPSP in motoneurons. J. Neurophysiol. 30:1169.

Russell, J.M., Brown, A.M. (1972) Active transport of chloride by the giant neuron of the Aplysia abdominal ganglion. J. Gen. Physiol. 60:499.

Schlote, F.W. (1955) Die Erregungsleitung im Gastropodennerven und ihr histologisches Substrat. Z. vergl. Physiol. 37:373.

Stefani, E., Gerschenfeld, H.M. (1969) Comparative study of acetylcholine and 5-HT receptors on single snail neurons. J. Neurophysiol. 32:64.

Stevens, C.F. (1969) Voltage clamp analysis of a repetitively firing neuron. In: Basic Mechanisms of the Epilepsies; Jasper, H., Ward, A.A., Pope, A. (eds.); Little, Brown & Co., Boston.

Sweeney, S. (1963) Dopamine: its occurence in molluscan ganglia. Science 139:1051.

Tauc, L., (1962a) Site of origin and propagation of spike in the giant neuron of Aplysia. J. Gen. Physiol. 45:1077.

Tauc, L., (1962b) Identification of active membrane areas in the giant neuron of Aplysia. J. Gen. Physiol. 45:1099.

Tauc, L. (1967) Transmission in invertebrate and vertebrate ganglia. Physiol. Rev. 47:521.

Tauc, L. (1966) Presynaptic inhibition in the abdominal ganglion of Aplysia. J. Physiol. 58:515.

Tauc, L., Epstein, R. (1967) Heterosynaptic facilitation as a distinct mechanism in Aplysia. Nature 214:724.

Thomas, R.C. (1972) Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. Physiol. Rev. 52:563.

Waziri, R. (1971) Electrotonically coupled interneurones produce two types of inhibition in Aplysia neurones. Nature New Biol. 232:286.

Zelenar, I., (1964) Progr. Brain Res. 13:286.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 1. Juni 1948 als erster Sohn von Dr. med. Ernst Daut und seiner Frau Elisabeth, geb. Schlotthauer, in Bad Dürkheim geboren. In Kallstadt an der Weinstraße, dem Wohnort meiner Eltern, besuchte ich von 1955 bis 1958 die Volksschule. Danach wechselte ich zum Staatl. Neuspr. Gymnasium in Bad Dürkheim, wo ich 1966 das Abitur ablegte. Von 1966 bis 1969 studierte ich an der Universität Heidelberg Medizin. Nach dem Physikum im Jahre 1969 ging ich für ein Jahr zum University College London. Dort studierte ich Physiologie und legte im Jahre 1970 das B.Sc. Examen ab. Danach begann ich mein klinisches Medizinstudium an der Technischen Universität München und meine Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie bei Dr. H.D. Lux. Im Jahre 1971 wechselte ich an die Ludwig Maximilians Universität München. Dort legte ich Ende 1973 mein Staatsexamen ab. Ab Januar 1974 werde ich mit Hilfe eines Cecil Rhodes Stipendiums für drei Jahre in Oxford studieren. Ich werde dort bei Dr. D. Noble eine Doktorarbeit (D.Phil.)im Fach Physiologie schreiben.

München, Dezember 1973 Jürgen Daut

A. u. R. Hintermaier, 8 München 90, Schlotthauerstr. 10, Telefon 6 51 55 45